

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Dunja I. Kokai

**UTICAJ ENDOKRINIH OMETAČA,
BISFENOLA A I DIBUTIL-FTALATA,
NA FUNKCIJU HUMANIH ENDOTELNIH
ĆELIJA U USLOVIMA *IN VITRO***

Doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Dunja I. Kokai

**IMPACT OF *IN VITRO* EXPOSURE TO
ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS
BISPHENOL A AND DIBUTYL PHTHALATE
ON THE FUNCTION OF HUMAN
ENDOTHELIAL CELLS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025

Mentori:

dr Bojana Stanić, viši naučni saradnik

Univerzitet u Novom Sadu – Prirodno-matematički fakultet

dr Jelena Đorđević, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Nebojša Andrić, vanredni profesor

Univerzitet u Novom Sadu – Prirodno-matematički fakultet

dr Jelena Marković Filipović, redovni profesor

Univerzitet u Novom Sadu – Prirodno-matematički fakultet

dr Dušanka Savić-Pavićević, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki dr Bojani Stanić bez koje ova doktorska disertacija ne bi bila moguća. Hvala na izuzetnoj posvećenosti, neizmernom strpljenju i požrtvovanosti. Hvala joj što je uvek nalazila vreme, snagu, reči ohrabrenja i bila vetar u leđa kada je to bilo potrebno. Hvala joj što je sa mnom ruku pod ruku koračala do cilja i hvala joj na svom znanju koje mi je prenela na tom putu.

Neizmernu zahvalnost dugujem šefu laboratorije, prof. dr Nebojši Andrić koji mi je u toku doktorskih studija bio poput drugog mentora. Hvala mu na prenesenom znanju, strpljenju, savetima i stalozhenosti koja mi je često bila neophodna da bih nastavila dalje sa radom.

Veliku zahvalnost upućujem Biljani Tešić. Samo Biljana i ja znamo sve uspone i padove kroz koje smo zajedno prošle kao studenti doktorskih studija. Dugujem joj zahvalnost jer je sve vreme bila moj oslonac, moralna podrška, ali pre svega prijatelj.

Veliko hvala dugujem Mariji Opačić i dr Dragani Samardžiji Nenadov na pomoći, srdačnosti i izlaženju u susret u pravim trenucima. Hvala upućujem i dr Kristini Pogrmic-Majkić, dr Svetlani Fa Nedeljković i Tamari Tomanić na kolegijalnosti, predusretljivosti i pozitivnom duhu koji su naš tim učinili nezamenjivim.

Mnogo hvala upućujem svojoj drugoj mentorki prof. dr Jeleni Dorđević i članovima komisije prof. dr Nebojši Andrić, dr Jeleni Marković Filipović i dr Dušanki Savić-Pavićević na savetima i sugestijama koje su učinile ovu doktorsku disertaciju kvalitetnijom i kompletnom.

Posebnu zahvalnost dugujem mami Ani, tati Stevi, Bojanu i Nemanji na beskrajnoj podršci, strpljenju i ljubavi jer bez njih ne bih bila tu gde jesam.

Najveće i najlepše hvala želim da uputim svom sinu Damianu jer je dao potpuno novi smisao životu i u svaki trenutak uneo lepotu, radost i novu energiju.

Uticaj endokrinih ometača, bisfenola A i dibutil-ftalata, na funkciju humanih endotelnih ćelija u uslovima *in vitro*

Sažetak

Bisfenol A (BPA) i dibutil-ftalat (DBP) su prisutni u mnogim proizvodima koje čovek svakodnevno koristi. Negativan uticaj ovih hemikalija na endokrini i reproduktivni sistem je dobro ispitan, ali su podaci o njihovom uticaju na kardiovaskularni sistem oskudni. Cilj ove doktorske disertacije je da se ispituju funkcijske i molekulske promene na humanim endotelnim ćelijama EA.hy926 koje se javljaju kao odgovor na dugotrajno (12-14 nedelja) izlaganje ćelija 10^{-9} , 10^{-8} i 10^{-7} M BPA i DBP i kratkotrajno (15 min – 48 h) izlaganje 10^{-7} , 10^{-6} i 10^{-5} M BPA i 10^{-6} , 10^{-5} i 10^{-4} M DBP u uslovima *in vitro*.

Dugotrajno i kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija BPA dovodi do funkcijskih i molekulskih promena koje pospešuju integritet endotela u uslovima *in vitro*: smanjeno vezivanje monocita za endotelne ćelije preko smanjenja relativne ekspresije gena za adhezivni molekul VCAM-1, povećana adhezija ćelija za želatin i smanjena migracija, smanjena propustljivost jednosloja endotelnih ćelija uz povećanu ekspresiju okcludina i ZO-1, kao i smanjeni nivo ROS, uz istovremeno povećano stvaranje NO preko ER i GPER i nizvodno aktivacijom signalnog puta PI3K/Akt i eNOS.

Dugotrajno i kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija DBP dovodi do funkcijskih i molekulskih promena koje narušavaju integritet endotela u uslovima *in vitro*: povećano vezivanje monocita za endotelne ćelije, promene u migraciji ćelija i angiogenezi, promene u propustljivosti jednosloja endotelnih ćelija uz odgovarajuće promene u ekspresiji okcludina i ZO-1, kao i povećano stvaranje NO preko ER i GPER i nizvodne aktivacije signalnih puteva PI3K/Akt, MAPK/ERK i eNOS. Utvrđeno je da ovi mehanizmi imaju ulogu u angiogenezi i migraciji ćelija, za koju je pokazano da se dešava uz povećanu aktivnost enzima MMP-2.

Ključne reči: endotelne ćelije, bisfenol A, dibutil-ftalat, endotelna disfunkcija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija eukariota

Impact of *in vitro* Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals Bisphenol A and Dibutyl Phthalate on the Function of Human Endothelial Cells

Abstract

Bisphenol A (BPA) and dibutyl phthalate (DBP) are present in many products people use daily. The negative impact of BPA and DBP on the endocrine and reproductive systems is well documented; however, the data regarding their impact on the cardiovascular system are scarce. The goal of this Doctoral Dissertation was to investigate whether *in vitro* long-term (12-14 weeks) exposure to 10^{-9} , 10^{-8} , and 10^{-7} M BPA and DBP and short-term (15 min – 48 h) exposure to 10^{-7} , 10^{-6} , and 10^{-5} M BPA and 10^{-6} , 10^{-5} , and 10^{-4} M DBP affects the functional and molecular properties of EA.hy926 cells.

Long-term and short-term exposure of EA.hy926 cells to BPA induces functional and molecular changes that promote endothelial integrity: decreased adhesion of monocytes to endothelial cells via decreased relative expression of VCAM-1, increased cell adhesion to gelatin and decreased migration, diminished endothelial permeability accompanied with increased expression of occludin and ZO-1, lower ROS levels, and increased NO synthesis via ER and GPER and downstream activation of the PI3K/Akt pathway and eNOS.

Long-term and short-term exposure of EA.hy926 cells to DBP induces functional and molecular changes that disrupt endothelial integrity: increased adhesion of monocytes to endothelial cells, alterations in cell migration and angiogenesis, changes in the permeability of the endothelial monolayer with relevant changes in the expression of occludin and ZO-1, as well as an increase in NO synthesis via ER and GPER and downstream activation of PI3K/Akt and ERK1/2 pathways and eNOS. It was concluded that these mechanisms have a role in the regulation of angiogenesis and cell migration, which was confirmed to occur with an increase in MMP-2 activity.

Keywords: endothelial cells, bisphenol A, dibutyl phthalate, endothelial dysfunction

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular Biology of Eukaryotes

Skraćenice

AC	– adenilil ciklaza
AhR	– aril-hidrokarbonski receptor
AJ	– adherentne veze
Akt	– protein kinaza B, PKB
AMPK	– protein kinaza koja se aktivira pomoću adenozin-monofosfata
BBP	– benzilbutil-ftalat
BCA	– bicinhoninska kiselina
bFGF	– bazni faktor rasta fibroblasta
BH ₄	– tetrahidrobiopterin
BPA	– bisfenol A
BSA	– albumin iz goveđeg seruma
CAM	– ćelijski adhezivni molekuli
CaM	– kalmodulin
CaMKII	– protein kinaza II zavisna od kalmodulina
cAMP	– ciklični adenozin monofosfat
CBB	– Coomassie Brilliant Blue
cGMP	– ciklični guanozin-monofosfat
CHB	– 3-hloro-4-hidroksibenzenska kiselina
CPF	– hlorspirifos
DBP	– dibutil-ftalat
DCF	– 2',7'-dihlorofluorescein
DCFH	– 2',7'-dihlorodihidrofluorescein
DEHP	– dietilheksil-ftalat
DEPC	– dietilpirokarbonat
DMEM	– Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	– dimetil-sulfoksid
E2	– 17β-estradiol
ECHA	– Evropska agencija za hemikalije
ECM	– vanćelijski matriks
EDC	– endokrini ometači
EDTA	– etilendiamintetrasirćetna kiselina
EFSA	– Evropska agencija za bezbednost hrane

EGF	– epidermni faktor rasta
eNOS	– endotelna azot-monoksid sintaza
ER	– estrogenski receptor
ERK1/2	– kinaza regulisana vanćelijskim signalima 1 i 2
FBS	– fetalni goveđi serum
FITC	– fluorescein-izotiocijanat
FSH	– folikulostimulišući hormon
G-CSF	– faktor stimulacije kolonije granulocita
GAPDH	– gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GDP	– guanozin difosfat
GJ	– komunikacijske, pukotinaste veze
GMP	– guanozin-monofosfat
GPCR	– receptor spregnut sa proteinom G
GPGR	– estrogenski receptor spregnut sa proteinom G
GTP	– guanozin trifosfat
H ₂ DCFDA	– 2',7'-dihlorodihidrofluorescein-diacetat
HBSS	– rastvor Hanks' Balanced Salt
HEPES	– N-2-hidroksietilpiperazin-N-2-etansulfonska kiselina
HIF-1 α	– faktor indukovan hipoksijom-1 α
HUVEC	– humane endotelne ćelije vene pupčane vrpce
ICAM-1	– međućelijski adhezivni molekul-1
ICAM-2	– međućelijski adhezivni molekul-2
IGF-1	– faktor rasta sličan insulinu-1
IL	– interleukin
iNOS	– inducibilna azot-monoksid sintaza
JAM	– spojni adhezivni molekuli
JNK	– c-Jun N-terminalna kinaza
KVB	– kardiovaskularne bolesti
LDL	– lipoproteini male gustine
LPS	– lipopolisaharidi
L-NAME	– N ω -nitro-L-arginin-metil-estar
MAPK	– protein kinaza aktivirana mitogenima
MAPKK	– kinaza MAPK (MEK1/2)

MAPKKK	– kinaza kinaze MAPK (Raf)
MBP	– monobutil-ftalat
MCP-1	– hemoatraktant za monocite-1
MEF2	– faktor pojačivač miocita 2
MMP	– matriksna metaloproteinaza
mTOR	– meta rapamicina kod sisara
NADPH	– nikotinamidadenindinukleotid-fosfat
NED	– N-(1-naftil)etilendiamin
NF-κB	– nukleusni faktor-κB
NMDR	– nemonotono dozno-zavisan odgovor
nNOS	– neuronska azot-monoksid sintaza
NO	– azot-monoksid
NOS	– azot-monoksid sintaza
O ₂ ^{•-}	– superoksid anjon radikal
•OH	– hidroksil radikal
ONOO ⁻	– peroksinitritni anjon
p90RSK	– ribozomalna S6 kinaza od 90 kDa
PAF	– faktor aktivacije trombocita
PBDE	– polibromovani difenil-etri
PBS	– fiziološki rastvor puferisan fosfatnim puferom
PDGF	– faktor rasta poreklom iz trombocita
PDK-1	– kinaza zavisna od fosfoinozitida-1
PECAM-1	– molekul endotelnih ćelija koji vezuje trombocite-1
PI3K	– fosfatidilinozitol 3-kinaza
PIP ₂	– fosfatidilinozitol (3,4)-bifosfat
PIP ₃	– fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfat
PKA	– protein kinaza A
PKC	– protein kinaza C
Ras	– hidrolaza GTP
ROS	– reaktivne vrste kiseonika
RTK	– receptor sa aktivnošću tirozin kinaze
RT-qPCR	– kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu
S1P	– sfingozin 1-fosfat

SA	– sulfanilna kiselina
SDS	– natrijumdodecil-sulfat
SDS-PAGE	– SDS-poliakrilamid gel elektroforeza
SRB	– sulforodamin B
TCA	– trihlorsirćetna kiselina
TJ	– čvrste veze
TNF- α	– faktor nekroze tumora α
VCAM-1	– molekul adhezije vaskularnih ćelija-1
VEGF	– vaskularni endotelni faktor rasta
VEGFR-1	– receptor za VEGF-1
VEGFR-2	– receptor za VEGF-2
VE-kadherin	– vaskularni endotelni kadherin
vWF	– von Willebrand-ov faktor
ZO	– <i>zonula occludens</i>

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Endotel krvnih sudova: struktura i funkcija.....	1
1.1.1. Uloga azot-monoksida u regulaciji fizioloških funkcija endotela	2
1.1.2. Uloga čvrstih međućelijskih veza u fiziološkoj regulaciji endotelne barijere	3
1.1.3. Uloga ćelijskih adhezivnih molekula u fiziološkom odgovoru endotelnih ćelija na inflamaciju	5
1.1.4. Angiogeneza u fiziološkim uslovima	6
1.2. Endotelna disfunkcija i ateroskleroza.....	7
1.2.1. Uloga azot-monoksida u endotelnoj disfunkciji i aterosklerozi.....	9
1.2.2. Uloga čvrstih međućelijskih veza u endotelnoj disfunkciji i aterosklerozi	11
1.2.3. Uloga ćelijskih adhezivnih molekula u endotelnoj disfunkciji i aterosklerozi	12
1.2.4. Angiogeneza u aterosklerozi.....	12
1.3. Signalni mehanizmi u endotelnim ćelijama.....	13
1.3.1. Signalni put fosfatidilinozitol 3-kinaze – protein kinaze B/Akt.....	13
1.3.2. Signalni put kinaza aktiviranih mitogenima.....	15
1.3.3. Signalni put endotelna azot-monoksid sintaza – azot-monoksid.....	18
1.4. Uticaj hemikalija iz radnog i životnog okruženja na razvoj kardiovaskularnih bolesti	21
1.5. Bisfenol A.....	22
1.5.1. Osnovne karakteristike i upotreba bisfenola A	22
1.5.2. Prisustvo bisfenola A u tkivima i telesnim tečnostima ljudi	23
1.5.3. Metabolizam bisfenola A.....	24
1.5.4. Regulatorna i ograničenja vezana za upotrebu bisfenola A	24
1.5.5. Bisfenol A kao endokrini ometač.....	25
1.5.6. Efekti bisfenola A na nivou kardiovaskularnog sistema	25
1.6. Dibutil-ftalat	26
1.6.1. Osnovne karakteristike i upotreba dibutil-ftalata	26
1.6.2. Prisustvo dibutil-ftalata u tkivima i telesnim tečnostima ljudi	27
1.6.3. Metabolizam dibutil-ftalata.....	28
1.6.4. Regulatorna i ograničenja vezana za upotrebu dibutil-ftalata	28
1.6.5. Dibutil-ftalat kao endokrini ometač	29
1.6.6. Efekti dibutil-ftalata na nivou kardiovaskularnog sistema	29
2. Ciljevi	31
3. Materijali i metode	32
3.1. Hemikalije.....	32
3.2. Gajenje ćelija u kulturi.....	32
3.2.1. Ćelijska linija EA.hy926	32
3.2.2. Ćelijska linija U937.....	34

3.3.	Izlaganje EA.hy926 ćelija bisfenolu A i dibutil-ftalatu	34
3.3.1.	Dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija bisfenolu A i dibutil-ftalatu	34
3.3.2.	Kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija bisfenolu A i dibutil-ftalatu	36
3.4.	Ispitivanje metaboličke aktivnosti ćelija testom sa bojom alamarBlue™.....	36
3.5.	Ispitivanje vezivanja monocita za endotelne ćelije	37
3.6.	Ispitivanje vezivanja ćelija za želatin	39
3.7.	Određivanje broja ćelija testom sa bojom sulforodamin B.....	40
3.8.	Ispitivanje migracije ćelija.....	40
3.8.1.	Ispitivanje migracije ćelija testom „zarastanja povrede“	40
3.8.2.	Ispitivanje migracije ćelija u Transwell sistemu.....	41
3.9.	Određivanje aktivnosti matriksnih metaloproteinaza pomoću želatinske zimografije.....	42
3.10.	Ispitivanje propustljivosti jednosloja endotelnih ćelija u Transwell sistemu	43
3.11.	Određivanje nivoa reaktivnih vrsta kiseonika pomoću reagensa H ₂ DCFDA.....	44
3.12.	Određivanje koncentracije nitrita metodom po Griess-u	45
3.13.	Određivanje koncentracije proteina metodom Pierce BCA	47
3.14.	Određivanje angiogeneze u uslovima <i>in vitro</i>	47
3.15.	Relativna kvantifikacija ekspresije gena metodom RT-qPCR.....	48
3.15.1.	Priprema uzoraka i izolacija ukupne RNK	48
3.15.2.	Reverzna transkripcija	49
3.15.3.	Kvantitativna RT-PCR analiza	50
3.16.	Kvantifikacija ekspresije i fosforilacije proteina metodom Western blot	51
3.16.1.	Priprema uzoraka za elektroforezu	51
3.16.2.	Elektroforeza, transfer proteina na membranu, detekcija i kvantifikacija proteina	52
3.17.	Statistička analiza	53
4.	Rezultati.....	54
4.1.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A.....	54
4.1.1.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na vijabilnost ćelija	54
4.1.2.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija	54
4.1.3.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule	55
4.1.4.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija nakon stimulacije sa faktorom nekroze tumora- α	56
4.1.5.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule nakon stimulacije sa faktorom nekroze tumora- α	57
4.1.6.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na adheziju ćelija za želatin	58
4.1.7.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na migraciju ćelija.....	59
4.1.8.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na propustljivost jednosloja endotelnih ćelija	60

4.1.9.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na ekspresiju okcludina i ZO-1	61
4.1.10.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na nivo reaktivnih vrsta kiseonika	62
4.1.11.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na stvaranje azot-monoksida	63
4.1.12.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena za eNOS	64
4.2.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A	65
4.2.1.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na vijabilnost ćelija	65
4.2.2.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija.....	65
4.2.3.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule	66
4.2.4.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na adheziju ćelija za želatin	66
4.2.5.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na migraciju ćelija.....	67
4.2.6.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena i aktivaciju matriksnih metaloproteinaza	67
4.2.7.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na propustljivost jednosloja endotelnih ćelija	69
4.2.8.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na nivo reaktivnih vrsta kiseonika..	69
4.2.9.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na stvaranje azot-monoksida	70
4.2.10.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena za eNOS	71
4.2.11.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na aktivaciju Akt i ERK1/2.....	71
4.3.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu.....	73
4.3.1.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na vijabilnost ćelija	73
4.3.2.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija.....	73
4.3.3.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule	74
4.3.4.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na adheziju ćelija za želatin	76
4.3.5.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na migraciju ćelija.....	77
4.3.6.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na propustljivost jednosloja endotelnih ćelija	78
4.3.7.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na ekspresiju okcludina i ZO-1 ...	78
4.3.8.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na nivo reaktivnih vrsta kiseonika	79
4.3.9.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na angiogenezu u uslovima <i>in vitro</i>	80
4.3.10.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za odabrane proteine uključene u kontrolu angiogeneze	82
4.3.11.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na stvaranje azot-monoksida ...	84

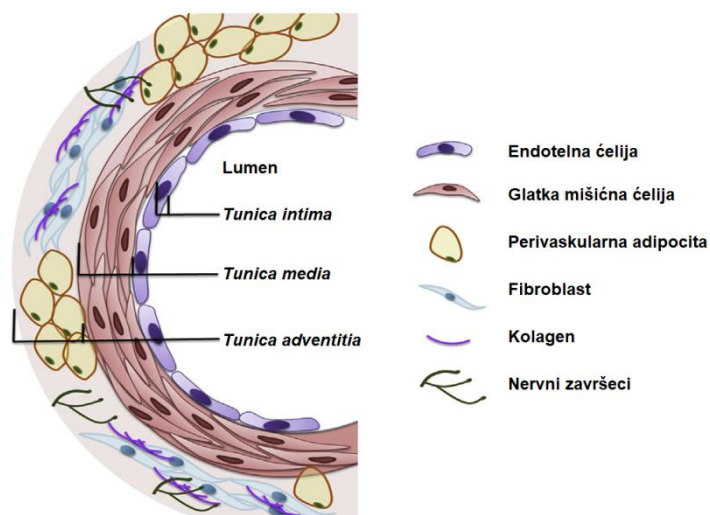
4.3.12.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za eNOS	84
4.3.13.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na ekspresiju i aktivaciju eNOS.	85
4.3.14.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na aktivaciju Akt	87
4.3.15.	Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na aktivaciju ERK1/2	87
4.4.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu	89
4.4.1.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na vijabilnost ćelija.....	89
4.4.2.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija.....	89
4.4.3.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule	90
4.4.4.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za IL-8 i MCP-1.....	91
4.4.5.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija u prisustvu antagonista ER, GPER i inhibitora signalnih puteva ERK1/2 i PI3K/Akt	92
4.4.6.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na adheziju ćelija za želatin....	92
4.4.7.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na migraciju ćelija	93
4.4.8.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na migraciju ćelija u prisustvu antagonista ER, GPER i inhibitora signalnih puteva ERK1/2, PI3K/Akt i eNOS-NO.....	94
4.4.9.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za matriksne metaloproteinaze i aktivnost matriksnih metaloproteinaza	94
4.4.10.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na aktivnost matriksnih metaloproteinaza u prisustvu antagonista GPER i inhibitora signalnih puteva ERK1/2 i eNOS-NO	95
4.4.11.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na propustljivost jednosloja endotelnih ćelija	96
4.4.12.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na ekspresiju okcludina i ZO-1 .	97
4.4.13.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na nivo reaktivnih vrsta kiseonika	97
4.4.14.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na angiogenezu u uslovima <i>in vitro</i>	98
4.4.15.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za odabrane proteine uključene u kontrolu angiogeneze	99
4.4.16.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na angiogenezu u uslovima <i>in vitro</i> u prisustvu inhibitora signalnih puteva ERK1/2, PI3K/Akt i eNOS-NO	100
4.4.17.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na stvaranje azot-monoksida	100
4.4.18.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za eNOS	101
4.4.19.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na ekspresiju i aktivaciju eNOS ..	102
4.4.20.	Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na aktivaciju Akt i ERK1/2	103

4.4.21. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na aktivaciju Akt, ERK1/2 i eNOS u prisustvu antagonista ER i GPER.....	104
4.4.22. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na stvaranje azot-monoksida u prisustvu antagonista ER i GPER.....	105
5. Diskusija.....	106
5.1. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A.....	106
5.2. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A.....	111
5.3. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu.....	112
5.4. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu.....	117
6. Zaključci.....	123
7. Literatura.....	125
8. Prilozi.....	146
Prilog A.....	146
Prilog B.....	152
Prilog C.....	157
Prilog D.....	159

1. Uvod

1.1. Endotel krvnih sudova: struktura i funkcija

Ukupna dužina vaskularne mreže kod odraslog čoveka iznosi preko 19.000 km, što je čini najvećim sistemom organa u ljudskom telu. Vaskularni unutrašnji sloj je pozicioniran između krvi i zida krvnog suda i sadrži više od 10^{12} endotelnih ćelija (Endemann i Schiffrin, 2004; Lee i sar., 2020; Camasão i Mantovan i, 2021). Ovaj sloj se naziva *tunica intima* i predstavlja gusti jednosloj endotelnih ćelija, koje naležu na bazalnu membranu sačinjenu od kolagenih vlakana tipa IV, laminina i heparin sulfatnih proteoglikana. Endotelne ćelije čine intimu svih krvnih sudova, ali u zavisnosti od tipa suda poseduju drugačije strukture i fenotipove. Endotelne ćelije u arterijama i venama su više a veze između njih uže u poređenju sa onima u kapilarima, koje su niže a pukotine između njih šire, kako bi se omogućila nesmetana razmena metabolita i gasova (Krüger-Genge i sar., 2019). Sloj *tunica intima* oblažu preostala dva sloja krvnog suda: središnji sloj, *tunica media*, sačinjen od spiralno raspoređenih slojeva glatkih mišićnih ćelija i elastičnih vlakana, i *tunica adventitia* koja predstavlja spoljašnji sloj građen od kolagenih i elastičnih vlakana, fibroblasta, masnog tkiva i kapilara (Newby, 2000) (slika 1.1).



Slika 1.1. Šematski prikaz poprečnog preseka krvnog suda.
Preuzeto uz modifikacije iz Zhao i saradnici (2015).

Dugo se smatralo da endotel predstavlja inertnu barijeru između cirkulišuće krvi i okolnog tkiva, međutim, danas se zna da je endotel aktivno metaboličko i endokrino tkivo koje ima ključnu ulogu u regulaciji vaskularne homeostaze (Krüger-Genge i sar., 2019). Endotelni jednosloj funkcioniše kao strogo regulisana polupropustljiva barijera čiji je integritet od krucijalnog značaja za normalnu razmenu metabolita, kiseonika, rastvorenih faktora i cirkulišućih ćelija između krvi i okolnih tkiva. Na taj način tkiva dobijaju sve neophodne materije iz krvi za optimalno funkcionisanje i eliminišu nepotrebne gasove i metabolite (Lee i sar., 2020; Gurevich i sar., 2021).

Endotel utiče na fiziologiju okolnog tkiva, kako glatkih mišićnih ćelija i pericita u zidu krvnog suda, tako i na fiziologiju cirkulišućih ćelija poput leukocita i trombocita. Naime, endotelne ćelije imaju širok dijapazon metaboličkih funkcija – vrše biosintezu i degradaciju vazoaktivnih medijatora, enzimskim putem smanjuju aktivnost reaktivnih vrsta kiseonika (eng. *reactive oxygen species*, ROS), obrađuju citokine, faktore rasta i supstance slične hormonima, sintetišu prostaglandine, transportuju i metabolišu lipoproteine, vrše sekreciju i remodelovanje vanćelijskog matriksa (eng. *extracellular matrix*, ECM) i dr. (Gimbrone i García-Cardena, 2016). Stoga, endotel predstavlja visoko dinamično tkivo koje detektuje i reaguje na hormonske i mehaničke stimuluse.

Kako predstavlja aktivno endokrino, autokrino i parakrino tkivo, u odgovoru na različite stimuluse sekretuje brojne i raznorodne biološki aktivne molekule, čime reguliše vaskularni tonus i homeostazu, protok krvi, vazomotorske funkcije i inflamacijske procese, inhibiše ćelijsku adheziju, aktivaciju trombocita i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija i dr. (Endemann i Schiffrin, 2004; Hadi i sar., 2005; Lee i sar., 2020; Gurevich i sar., 2021). Dakle, u fiziološkim uslovima endotel ispoljava antiinflamacijski, antitrombogeni i antiproliferacijski fenotip (Krüger-Genge i sar., 2019).

Kada je endotel fizički povređen ili funkcijski poremećen usled ishemijske reperfuzije, akutne ili hronične inflamacije i sličnih promena, reaguje na navedene promene odgovorima koji su u potpunosti suprotni gorenavedenim. Protrombogeno i proinflamacijsko stanje endotelnih ćelija karakteriše vazokonstrikcija krvnog suda i aktivacija i adhezija trombocita i leukocita. Te procese endotel podstiče povećanom sintezom i ekspresijom faktora na površini ćelija poput von Willebrand-ovog faktora (vWF), faktora aktivacije trombocita (eng. *platelet-activating factor*, PAF), interleukina-8 (IL-8), P-selektina i faktora nekroze tumora α (eng. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), što dalje stimuliše sve faze hemostaze (Becker i sar., 2000), kao i vezivanje i migraciju leukocita kroz endotel u cilju saniranja povrede (Cerutti i Ridley, 2017).

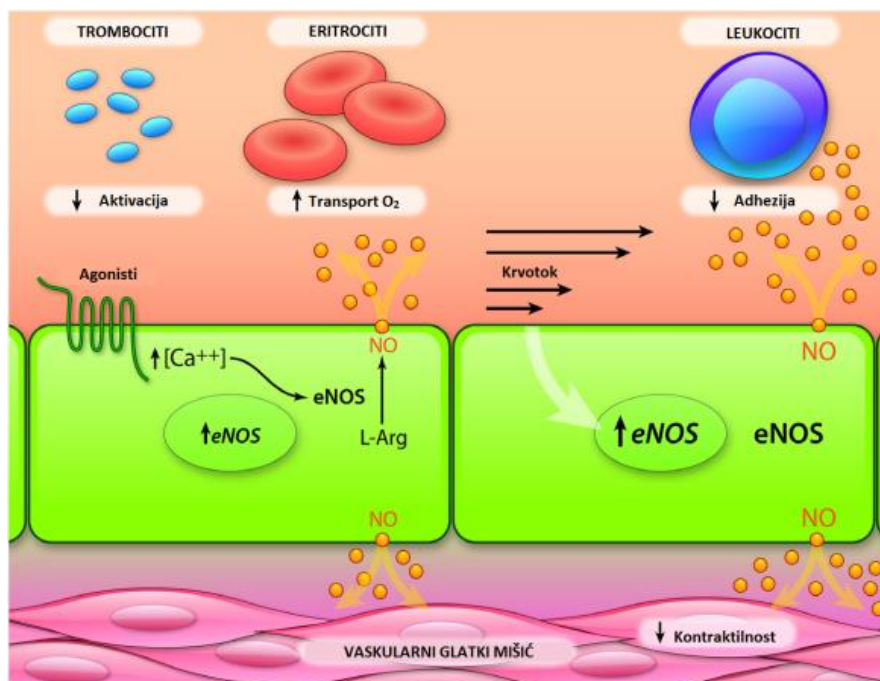
1.1.1. Uloga azot-monoksida u regulaciji fizioloških funkcija endotela

Posebno se ističe sposobnost endotela da sintetiše azot-monoksid (NO), molekul čije je otkriće bilo od izuzetne važnosti za razumevanje vaskularne fiziologije. NO je gas koji je, pre nego što je okarakterisan, nosio naziv „opuštajući faktor endotelnog porekla“ (eng. *endothelium derived relaxing factor*, EDRF). NO u endotelnim ćelijama nastaje prilikom oksidacije L-arginina do L-citrulina uz učešće enzima endotelne NO sintaze (eng. *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS).

Zbog svojih antioksidativnih i antiinflamacijskih svojstava NO ima ključnu ulogu u održavanju vaskularne homeostaze (Gimbrone i García-Cardena, 2016; Cyr i sar., 2020). Bazalna produkcija NO u fiziološkom stanju je neophodna radi regulisanja tonusa i održavanja zdravlja krvnog suda. Naime, sinteza NO je stimulisana fluktuacijama u krvnom pritisku i hormonskim stimulusima iz krvi. Ovi stimuli pokreću proces sinteze NO, a transkripcija gena koji kodira eNOS je takođe regulisana istim tim mehaničkim silama fluida, odnosno krvi (Gimbrone i García-Cardena, 2016). Sintetisani NO difunduje kroz membrane endotelnih ćelija i kao parakrini medijator utiče na glatke mišićne ćelije, leukocite i trombocite (Gimbrone i García-Cardena, 2016). NO podstiče vazodilataciju krvnog suda na taj način što aktivira solubilnu formu guanil ciklaze, koja prevodi guanozin-monofosfat (GMP) u ciklični GMP (cGMP) u glatkim mišićnim ćelijama (Förstermann i Sessa, 2012). Pored toga, NO, otpušten u cirkulaciju, inhibiše agregaciju trombocita i njihovu adheziju za endotel, čime se sprečava tromboza (Förstermann i Sessa, 2012; Gimbrone i García-Cardena, 2016). Na taj način se reguliše protok krvi i homeostaza (Gimbrone i García-Cardena, 2016). NO, osim što sprečava adheziju trombocita, sprečava i proliferaciju i migraciju glatkih mišićnih ćelija, kao i apoptozu endotelnih ćelija. Inhibiše i adheziju monocita, kao i njihovu migraciju u subendotelni prostor tako što smanjuje ekspresiju proteina koji deluje kao hemoatraktant za monocite-1 (eng. *monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1) u endotelnim ćelijama (Förstermann i Sessa, 2012; Cyr i sar., 2020). Pored toga, NO učestvuje u raznim drugim procesima kao što su regulacija sistemske distribucije kiseonika, egzocitoza, aktivnost jonskih kanala, apoptoza i proliferacija ćelija kardiovaskularnog sistema i neovaskularizacija (Förstermann i Sessa, 2012; Gimbrone i García-Cardena, 2016) (slika 1.2). Zbog svega navedenog, NO se smatra protektivnim molekulom vaskulature (Förstermann i Münzel, 2006).

Prilikom povrede tkiva, povećava se nivo aktivnog NO poreklom iz endotela. Time se pojačava efekat NO koji, kao i u zdravom stanju krvnog suda, sprečava migraciju glatkih mišićnih ćelija i inhibiše adheziju leukocita za endotelne ćelije, a samim tim i formiranje neointime i dalje oštećenje krvnog suda (Newby, 2000; Förstermann i Sessa, 2012). Iako se NO pretežno sintetiše u

endotelnim ćelijama, dodatne količine NO se u uslovima inflamacije sintetisuje i u glatkim mišićnim i inflamacijskim ćelijama. Time se pruža dodatna zaštita tkiva od oštećenja (Newby, 2000). Studije su pokazale da u slučaju nedovoljne produkcije fiziološki aktivnog NO od strane endotelnih ćelija dolazi do formiranja klinički značajnih aterosklerotskih promena (Gimbrone i García-Cardeña, 2016). Dakle, sekrecija NO predstavlja veoma važan mehanizam očuvanja fiziologije krvnog suda, a u stanju inflamacije predstavlja važan mehanizam odbrane endotelnih ćelija koji ćelije koriste da spreče dalji razvoj upalnih procesa i ateroskleroze (Newby, 2000).

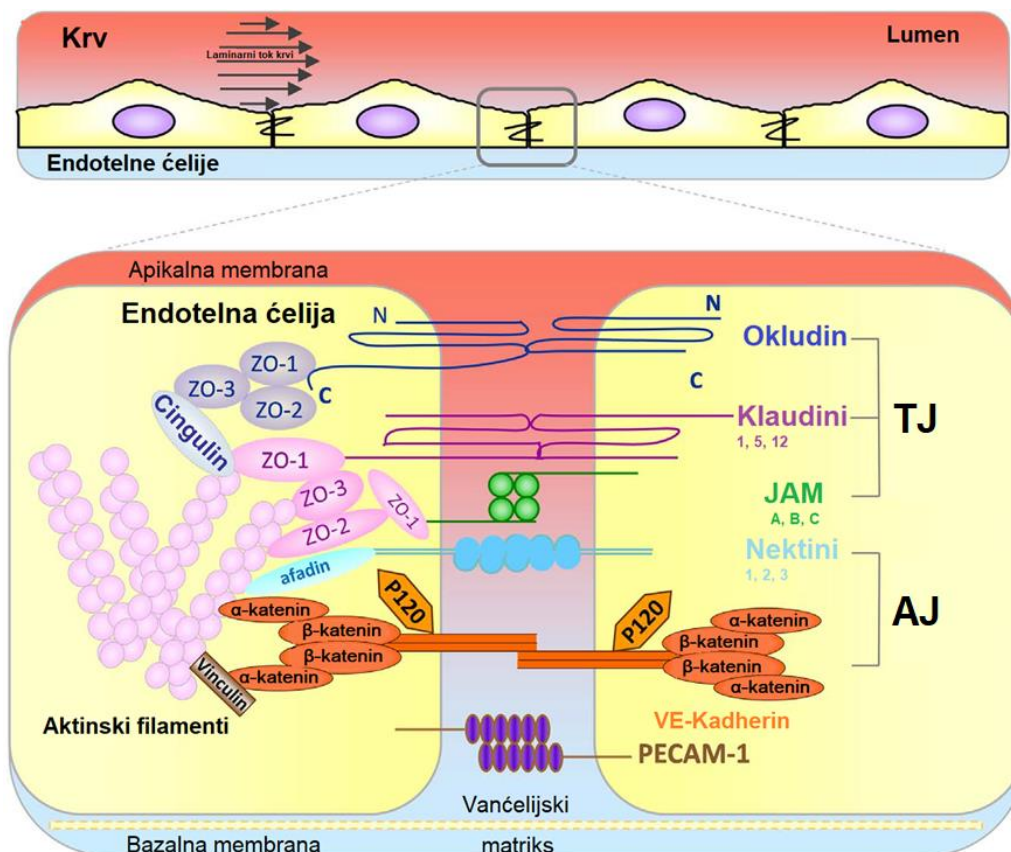


Slika 1.2. Uloga azot-monoksida u vaskulaturi. eNOS – endotelna azot-monoksida sintaza; NO – azot-monoksid. Preuzeto iz Gimbrone i García-Cardeña (2016).

1.1.2. Uloga čvrstih međucelijskih veza u fiziološkoj regulaciji endotelne barijere

Endotelne ćelije u krvnom sudu formiraju polupropustljivu membranu čija je uloga da odvoji krv od perifernih organa i tkiva, te samim tim ima ključnu ulogu i u održavanju homeostaze vaskularnog sistema (Arroyo i Iruela-Arispe, 2010; Franco i sar., 2013). Interakcije između susednih endotelnih ćelija se ostvaruju preko tri tipa veza: adherentne veze (eng. *adherens junctions*, AJ), komunikacijske pukotinaste veze (eng. *gap junctions*, GJ) i čvrste veze (eng. *tight junctions*, TJ). U međucelijskom prostoru su takođe eksprimirani i receptori poput molekula endotelnih ćelija za vezivanje trombocita-1 (eng. *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, PECAM-1) (pregledni rad Sluiter i sar., 2021). GJ čine transmembranski polukanali koneksoni, koji omogućavaju direktnu komunikaciju između endotelnih ćelija, koja se obavlja razmenom jona i malih signalnih molekula (pregledni rad Sluiter i sar., 2021). AJ su uglavnom sačinjene od kadherina i daju mehaničku čvrstinu međucelijskim vezama (pregledni rad Sluiter i sar., 2021), dok TJ grade transmembranski proteini okcludin, kladudin, spektrin, cingulin i spojni adhezivni molekuli (eng. *junctional adhesion molecules*, JAM) (Alexander i Elrod, 2002; pregledni rad Sluiter i sar., 2021). TJ se nalaze pri vrhu ćelije i kompletno je okružuju, a predstavljaju mesto spajanja membrana susednih ćelija. Čvrste veze omogućavaju endotelu da funkcioniše kao snažna barijera između cirkulacije i okolnog tkiva koja strogo reguliše paraćelijsku propustljivost (Fisher, 2008; pregledni rad Sluiter i sar., 2021). Naime, TJ kontrolišu paraćelijsku propustljivost endotela na taj način što učestvuju u regulaciji difuzije tečnosti, jona i malih proteina iz krvne plazme, kao i prolaska imunskih ćelija poput leukocita, neutrofila i limfocita, te predstavljaju svojevrsnu barijeru u krvnom sudu. Pored toga, TJ učestvuju i u polarnosti ćelije jer formiraju barijeru koja sprečava

difuziju apikalnih i bazolateralnih membranskih proteina i lipida (Cong i Kong, 2020). TJ su pomoću proteina skele (eng. *scaffold proteins*), kao što su *zonula occludens* (ZO) 1, 2 i 3, čvrsto vezani međusobno, ali i za proteine citoskeleta (Alexander i Elrod, 2002; Čejková i sar., 2016). S tim u vezi, pokazano je da protein ZO-1 interaguje sa domenima na C kraju okcludina i kladina i sa globularnim regionom na N kraju cingulina (slika 1.3). Pored toga, domen okcludina koji vezuje proteine ZO je takođe potreban za pravilnu lokalizaciju okcludina u TJ, što ukazuje na to da proteini ZO služe kao „skela” za organizaciju TJ, odnosno predstavljaju regulatorne proteine ovih veza. Pored toga, proteini ZO imaju glavnu ulogu u povezivanju TJ sa citoskeletom, pre svega sa F-aktinom (Solár i sar., 2020).



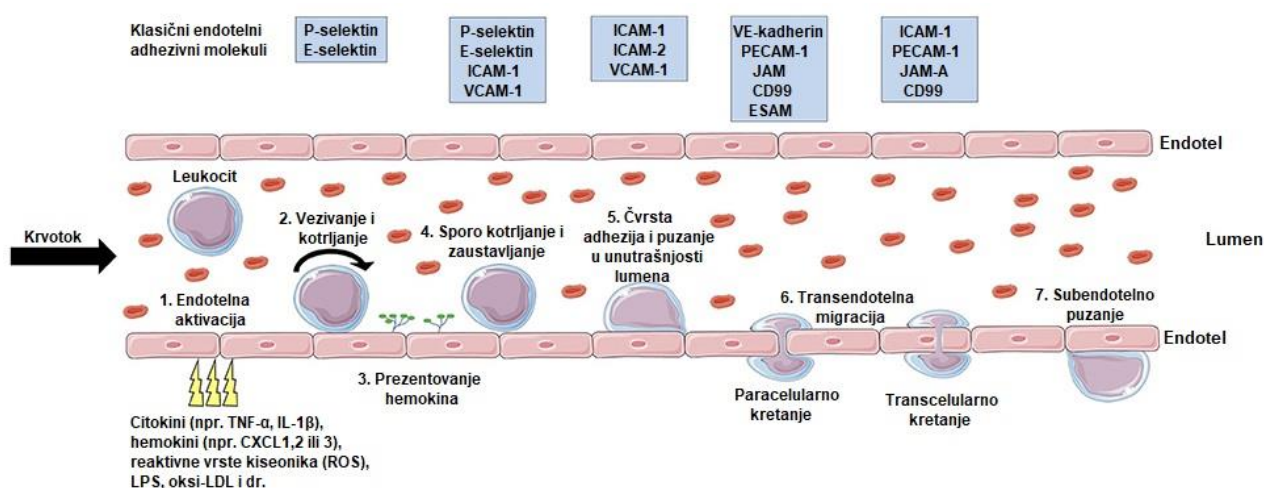
Slika 1.3. Šematski prikaz molekulske strukture čvrstih i adherentnih međućelijskih veza. AJ – adherentne veze; JAM – spojni adhezivni molekuli; PECAM-1 – molekul endotelnih ćelija koji vezuje trombocite-1; TJ – čvrste veze; ZO – *zonula occludens*. Preuzeto uz modifikacije iz Cerutti i Ridley (2017).

Povreda endotela, odnosno prekid u jednosloju endotelnih ćelija, može da dovede do poremećaja u funkcionisanju i integritetu ove barijere. Srećom, endotelne ćelije su veoma pokretne i imaju snažan potencijal za migraciju (Franco i sar., 2013). Endotel nije statičan jednosloj, nego veoma dinamično tkivo sa konstantnim ćelijskim pokretima pomoću kojih se tkivo remodeluje. Razlog za to je konstantna potreba za prilagođavanjem potrebama krvi i tkiva koja okružuju endotelni jednosloj (Arroyo i Iruela-Arispe, 2010). Tako, u slučaju povrede, endotelne ćelije reaguju na prekide u jednosloju i migriraju u nepopunjene prostore. Endotelne ćelije interaguju sa komponentama ECM i na taj način strogo kontrolišu proces saniranja povreda. Štaviše, endotelne ćelije sintetišu enzime koji remodeluju ECM koji se zovu matriksne metaloproteinaze (MMP), što omogućava migraciju endotelnih ćelija i saniranje povrede (Arroyo i Iruela-Arispe, 2010).

1.1.3. Uloga ćelijskih adhezivnih molekula u fiziološkom odgovoru endotelnih ćelija na inflamaciju

Još jedna od mnogih funkcija endotela je njegova uloga u mehanizmima reparacije u slučajevima oštećenja okolnog tkiva i infekcije (Tesfamariam, 2016; Cerutti i Ridley, 2017). Takve promene u tkivu pokreću niz fizioloških promena u endotelnim ćelijama što dalje pokreće vezivanje, a potom i transendotelnu migraciju makrofaga i monocita u subendotelni prostor (Cerutti i Ridley, 2017). Naime, endotelne ćelije reaguju na promene u okolnom tkivu i aktiviraju se. Postoje dva tipa aktivacije endotela. Tip 1 je brza aktivacija endotela, pri kojoj endotelne ćelije reaguju na inflamacijske stimulse tako što na svojoj površini brzo ekspimiraju ranije sintetisane adhezivne molekule, te je ovaj proces nezavisan od sinteze proteina (Nourshargh i Alon, 2014). P-selektin i E-selektin, međućelijski adhezivni molekul-1 (eng. *intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1) i molekul adhezije vaskularnih ćelija-1 (eng. *vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1) su proteini iz grupe ćelijskih adhezivnih molekula (eng. *cellular adhesion molecules*, CAM) koji se ekspimiraju na površini endotelnih ćelija i zaslužni su za vezivanje leukocita (Gurevich i sar., 2021). Promene u rigidnosti tkiva, u protoku krvi, prisustvo proinflamacijskih hemokina i citokina i mnogi drugi stimulusi iz krvi takođe mogu da izazovu povećan nivo ekspresije ovih molekula (Cerutti i Ridley, 2017). Proinflamacijski faktori poput citokina, posebno TNF- α , i hemokina takođe indukuju i tip 2 aktivacije endotela koji predstavlja sporiju reakciju koja traje nekoliko časova. Tip 2 predstavlja aktivaciju plejotropnih transkripcionih faktora i *de novo* transkripciju gena koji kodiraju molekule odgovorne za vezivanje i migraciju leukocita (Nourshargh i Alon, 2014).

Prvi korak u vezivanju leukocita predstavljaju slabe i prolazne adhezivne interakcije sa endotelom u blizini tkiva pod inflamacijom. Nakon toga sledi čvrsto vezivanje leukocita za zid krvnog suda, jačanje adhezije, puzanje leukocita, i na kraju njihova migracija između endotelnih ćelija u subendotelni prostor (tzv. ekstravazacija). Ovi sukcesivni koraci se međusobno nadovezuju i svaki je preduslov za naredni. Svi su uslovljeni prisustvom već navedenih adhezivnih molekula i selektina na površini endotela (Nourshargh i Alon, 2014). Transendotelna migracija monocita/leukocita je veoma važan mehanizam odbrane u slučaju inflamacije i povrede tkiva. Ovaj proces je strogo kontrolisan i krajnje neophodan za održavanje optimalne fiziologije tkiva (slika 1.4).

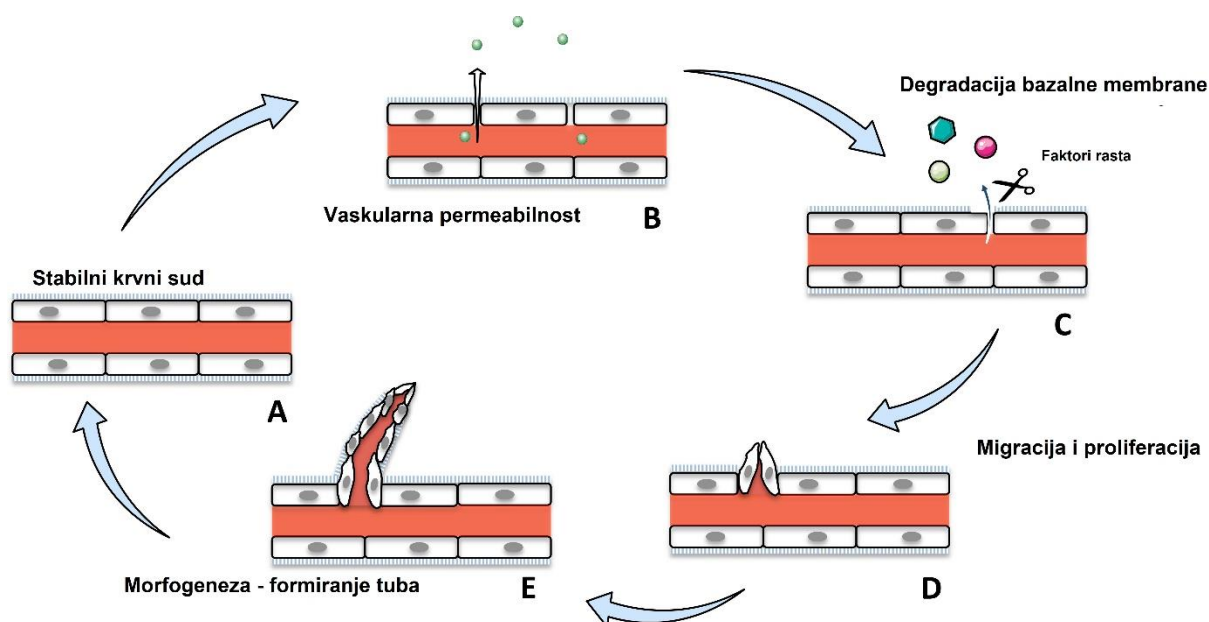


Slika 1.4. Šematski prikaz kaskade vezivanja leukocita za zid krvnog suda. CD99 – glikoprotein sa jednim lancem, tip 1; CXCL1, 2 ili 3 – pripadnici CXCL familije hemokina; ESAM – molekul adhezije koji selektuje endotelne ćelije; ICAM-1 – međućelijski adhezivni molekul-1; ICAM-2 – međućelijski adhezivni molekul-2; IL-1 β – interleukin 1 β ; JAM – spojni adhezivni molekuli; LPS – lipopolisaharidi; oksidovani lipoproteini male gustine; PECAM-1 – molekul endotelnih ćelija koji vezuje trombocite-1; TNF- α – faktor nekroze tumora α ; VCAM-1 – molekul adhezije vaskularnih ćelija-1; VE-kadherin – vaskularni endotelni kadherin. Preuzeto uz modifikacije iz Patten i Shetty (2018).

1.1.4. Angiogeneza u fiziološkim uslovima

Neovaskularizacija je pojava stvaranja novog krvnog suda koja se dešava u raznim fiziološkim procesima kao što su embriogeneza i promene u endometriju tokom menstrualnog ciklusa, ali i u patofiziološkim uslovima poput ishemije, inflamacije, zarastanja rana, hipertrofije tkiva, rasta tumora, ateroskleroze i dr. (Felmeden i sar., 2003; Simons, 2005). Postoje tri tipa neovaskularizacije: angiogeneza, vaskulogeneza i arteriogeneza (Simons, 2005). Angiogeneza podrazumeva proces formiranja novih krvnih sudova od postojećih („pupljenje”) i za posledicu ima uvećanje protoka krvi 2–3 puta. Arteriogeneza predstavlja *de novo* formiranje ili remodelovanje postojećih arterija (slika 1.5). Tokom ovog procesa dolazi do brze proliferacije ćelija iz već postojećih kolateralnih krvnih sudova. Kao rezultat arteriogeneze protok krvi se uvećava 20–30 puta. Vaskulogeneza podrazumeva *de novo* formiranje ili remodelovanje postojećih krvnih sudova od strane cirkulišućih vaskularnih progenitorskih ćelija (Felmeden i sar., 2003). Funkcijski značaj ovog tipa neovaskularizacije je nepoznat.

Angiogeneza je jedan od ključnih mehanizama u mnogim fiziološkim i patofiziološkim procesima (Felmeden i sar., 2003; Simons, 2005; Lamalice i sar., 2007). Angiogeneza se normalno javlja tokom embrionalnog razvoja, menstrualnog ciklusa i formiranja placente nakon oplodnje, tokom zarastanja rana, zarastanja i rasta kostiju i kose (Carmeliet i sar., 2003; Stegen i sar., 2015). U fiziološkim uslovima angiogeneza je izbalansirana i strogo kontrolisana od strane proangiogenih i antiangiogenih faktora (Hu i sar., 2015). U proangiogene faktore se svrstavaju vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), TNF- α , angiogenin, epidermalni faktor rasta (eng. *epidermal growth factor*, EGF), estrogeni, prostaglandini, faktor stimulacije kolonije granulocita (eng. *granulocyte-colony stimulating factor*, G-CSF) i drugi, dok se u inhibitori angiogeneze ubrajaju angiostatin, endostatin, kalretikulin, trombospondin-1, tkivni inhibitori metaloproteinaza, interleukini, interferoni i prostaglandini (Tonini i sar., 2003). Procesom angiogeneze se stvaraju kapilari, dok je u nekim slučajevima zabeleženo i stvaranje većih krvnih sudova (Felmeden i sar., 2003; Simons, 2005).



Slika 1.5. Šematski prikaz angiogeneze u fiziološkim uslovima. Povećanje permeabilnosti krvnog suda (A), omogućava ekstravazaciju proteina plazme (B). Matriksne metaloproteinaze (simbolično prikazane makazama) degradiraju komponente vanćelijskog matriksa, što dovodi do oslobađanja faktora rasta (C). Endotelne ćelije migriraju i proliferišu (D), a zatim podležu morfogenezi i formiranju tuba sa centralnim lumenom (E). Preuzeto uz modifikacije iz Montemagno i Pagés (2020).

Rast novih krvnih sudova može biti pokrenut u uslovima hipoksije, koja kod sisara predstavlja jedan od najznačajnijih stimulusa za angiogenezu (Simons, 2005; pregledni rad Camaré i sar., 2017). U uslovima hipoksije aktivira se faktor indukovani hipoksijom-1 α (eng. *hypoxia-inducible factor-1 α* , HIF-1 α) koji dalje aktivira transkripcione faktore za gene koji kodiraju VEGF i njegove receptore tipa-1 (VEGFR-1, kodiran genom *FLT1*) i tipa-2 (VEGFR-2, kodiran genom *KDR*). Ovi receptori, eksprimirani na površini endotelnih ćelija, stimulišu ćelijsku migraciju, mitogenezu, diferencijaciju endotelnih ćelija, vaskularnu propustljivost i organizaciju krvnog suda, što indukuje angiogenezu (Felmeden i sar., 2003; Simons, 2005). Pored toga, VEGF indukuje sintezu NO u endotelnim ćelijama tokom angiogeneze koji takođe stimuliše stvaranje novog krvnog suda (Felmeden i sar., 2003).

Adhezija i migracija ćelija kroz ECM su neizostavni odgovori endotelnih ćelija tokom angiogeneze i očuvanja integriteta okolnog tkiva (Malinin i sar., 2012). Ovi procesi omogućavaju ćeliji da se veže za ECM i učestvuje u ćelijskoj signalizaciji (Reinhart-King, 2008). Molekuli koji pripadaju grupi receptora odgovornih za adheziju ćelija za ECM nazivaju se integrini. U pitanju su glikoproteini heterodimerne strukture koji se formiraju nekovalentnim vezama između α i β subjedinice (Barczyk i sar., 2010). Kod viših sisara je opisano 18 α i 8 β subjedinica koje se spajaju u više od 24 različitih heterodimera. Integrini su podeljeni prema vanćelijskom supstratu za koji se vezuju, pa se tako dele na receptore za: fibronektin ($\alpha4\beta1$, $\alpha5\beta1$), kolagen ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$), laminin ($\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$ i $\alpha6\beta4$), osteopontin ($\alpha9\beta1$) i vitronektin ($\alpha v\beta3$ i $\alpha v\beta5$). U procesu migracije endotelnih ćelija i angiogeneze su ključni integrini $\alpha v\beta3$, $\alpha v\beta5$, $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha4\beta1$ i $\alpha5\beta1$ koji omogućavaju ćelijsku adheziju za bazalnu membranu. Pokazano je da je njihova ekspresija povećana tokom procesa angiogeneze (Silva i sar., 2008).

1.2. Endotelna disfunkcija i ateroskleroza

Kao što je prethodno opisano, endotelne ćelije u uslovima povrede ili inflamacije aktiviraju kompleksne mehanizme odbrane i oporavka tkiva. Kada dođe do oštećenja krvnog suda, susedne ćelije se aktiviraju u regeneraciji oštećenog tkiva (Clowes, 2006). Uzroci oštećenja krvnih sudova su mnogobrojni, ali je zapaženo da intenzitet odgovora krvnog suda na oštećenje pretežno zavisi od težine povrede i od toga da li se povreda ponavlja (Clowes, 2006). Akutni odgovor na povredu, odnosno stimulacija endotela je brza, ograničenog je trajanja i obično ne uzrokuje trajne funkcijske i morfološke promene (Gimbrone i García-Cardena, 2016). Ipak, ovakva endotelna aktivacija u okolnostima kao što su oksidativni stres, inflamacija, akutna infekcija, trovanje i dr. može da bude okidač za endotelnu disfunkciju. Endotelna disfunkcija predstavlja prvi korak u nastanku ateroskleroze koji se odlikuje gubitkom funkcija specifičnih za intaktni endotel, a podrazumeva povećanu sintezu i sekreciju citokina, hemokina, ekspresiju CAM za leukocite i trombocite, povećanu propustljivost endotela, kao i vazokonstrikciju krvnih sudova (Deanfield i sar., 2007; Poredos i sar., 2021; Ivničsky i sar., 2023). U slučajevima kada dolazi do nepovratnog gubitka integriteta i funkcije endotela, ove promene izazivaju orkestriranu akutnu ili hroničnu inflamaciju (Gimbrone i García-Cardena, 2016). Posledično može doći do nepovratnih promena u odnosu na normalan funkcijski fenotip endotelnih ćelija, što dalje utiče na regulaciju hemostaze, lokalnog vaskularnog tonusa i redoks balansa, na vaskularno remodelovanje, vazokonstrikciju i trombozu (Hadi i sar., 2005; Gimbrone i García-Cardena, 2016).

Osnovni koraci u nastanku endotelne disfunkcije uključuju povećanu ekspresiju CAM na površini endotelnih ćelija kao odgovor na aktivaciju ćelija od strane citokina i drugih stimulusa, što za posledicu dalje ima povećan afinitet leukocita za površinu endotela, narušenu endotelnu barijeru i povećan prolaz leukocita u subendotelni prostor, zatim povećan vaskularni mišićni tonus usled smanjene produkcije vazodilatacijskih molekula poput NO i povećane produkcije vazokonstriktorskih supstanci, a povećava se i mogućnost za stvaranje tromba (Bonetti i sar., 2003;

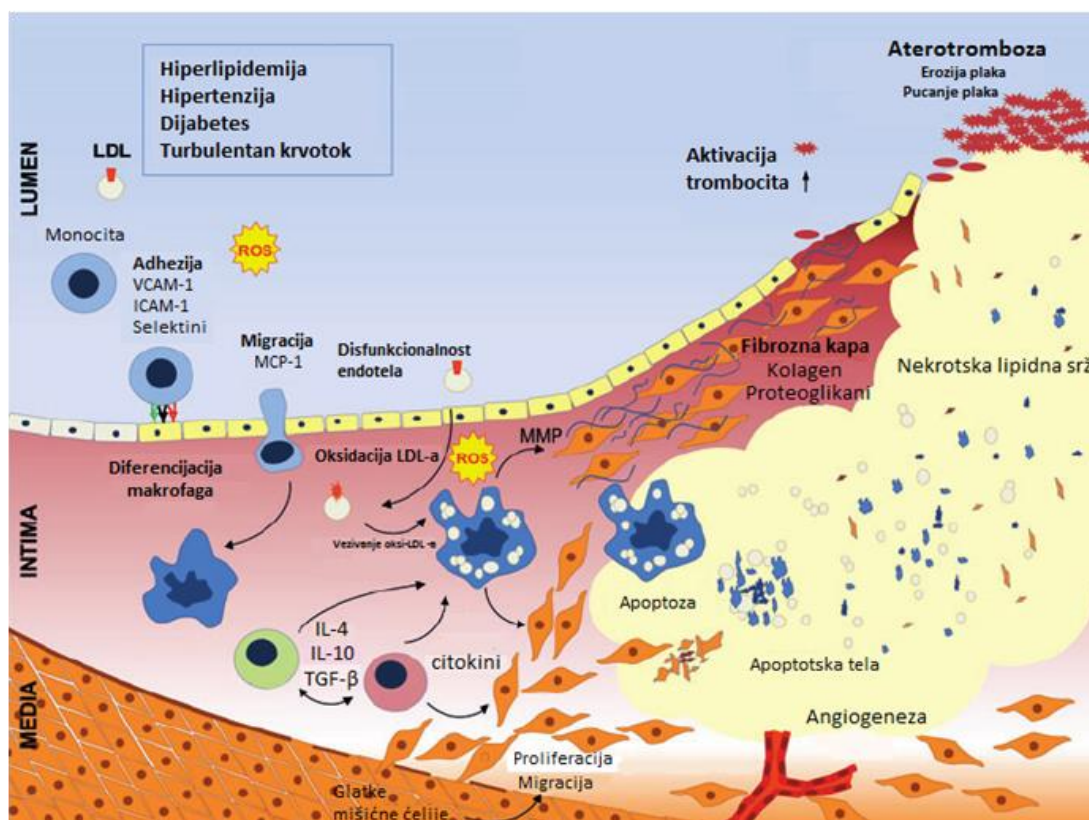
Steyers i Miller, 2014). Ovi procesi se smatraju ključnim koracima u patogenezi ateroskleroze (Ross, 1999; Davignon i Ganz, 2004).

Ateroskleroza je sistemsko zapaljenje velikih krvnih sudova i u osnovi je većine kardiovaskularnih bolesti (KVB), zbog čega je godinama unazad vodeći uzrok bolesti i smrtnih ishoda u industrijski razvijenim državama (Gimbrone i García-Cardena, 2013; Steinl i Kaufmann, 2015). Aterosklerotsko formiranje plaka, odnosno zadebljanje zida krvnog suda usled povrede i inflamacije, godišnje odnese najviše života na globalnom nivou (Johnson, 2017). Ateroskleroza može da se pojavi u ranom životnom dobu i da se razvija dugi niz godina, decenijama, tiho, bez ispoljavanja simptoma (Getz i Reardon, 2012; Steinl i Kaufmann, 2015). Upravo disfunkcionalni endotel inicira razvoj aterosklerotskih promena u krvnom sudu, koje na kraju dovode do formiranja fibromuskularnog plaka i posledično do sužavanja lumena krvnog suda, uzrokujući otežan protok krvi i simptome ishemijske tkiva (Gimbrone i García-Cardena, 2016). U slučaju nestabilnog plaka, njegovo pucanje aktivira procese agregacije trombocita i koagulaciju, što indukuje formiranje tromba koji može da dovede do konačnih ishoda poput infarkta miokarda, cerebrovaskularnih oštećenja i bolesti perifernih krvnih sudova (Poston, 2019).

Ateroskleroza odlikuje kaskada događaja među kojima se ističu endotelna disfunkcija, oksidacija holesterola vezanog za lipoproteine male gustine (eng. *low density lipoprotein*, LDL), inflamacija i proliferacija glatkih mišićnih ćelija (El Hadri i sar., 2022). Navedeni događaji utiču na stvaranje aterosklerotskih plakova u krvnim sudovima koji, što se više razvijaju, dalje vode ka sve ozbiljnijim kardiovaskularnim smetnjama, a vremenom ka oštećenjima i komplikacijama (Steinl i Kaufmann, 2015). Mnoge ćelije su uključene u proces ateroskleroze – endotelne ćelije, limfociti, makrofagi, dendritske ćelije i glatke mišićne ćelije krvnog suda (Zhu i sar., 2018). Jedan od važnijih uzroka povrede krvnog suda je povećana koncentracija LDL u krvi i njihova akumulacija u neointimi, u novoformiranom sloju krvnog suda ispod endotelnog jednosloja (slika 1.6). Naime, oštećenje endotela, turbulentan protok krvi i poremećaji u metabolizmu lipida, odnosno hiperlipidemija, posledično dovode do akumulacije lipida u subendotelnom prostoru i do inflamacijskih promena na nivou endotela (Zhu i sar., 2018). LDL se potom oksidiše do oksidovanog LDL, što vodi ka aktivaciji endotela. Akumulirani LDL, osim što narušava integritet endotela, takođe vezuje i akumulira makrofage. Dalja oksidacija LDL se dešava usled visoke koncentracije ROS poreklom iz glatkih mišićnih, endotelnih i inflamacijskih ćelija (Newby, 2000). Osim oksidovanog LDL, na aktivaciju endotela utiču i svi faktori koji povećavaju oksidativni stres u krvnom sudu, poput povišenog krvnog pritiska, dijabetesa, pušenja cigareta i dr. (Jaipersad i sar., 2014; Steinl i Kaufmann, 2015). Oksidativni stres u endotelnim ćelijama dovodi do povećane ekspresije CAM poput VCAM-1, ICAM-1, MCP-1, E-selektina, P-selektina i drugih inflamacijskih faktora (Jaipersad i sar., 2014; Steinl i Kaufmann, 2015) koji privlače monocite i limfocite, čime započinje inflamacijski proces (slika 1.6). Naime, posredstvom navedenih CAM se monociti vezuju za endotelne ćelije. Nakon toga, sledi valjanje monocita po površini endotela, zaustavljanje, puzanje i na kraju njihova ekstravazacija, odnosno njihov prolazak kroz monosloj endotela (Woollard i Geissmann, 2010). Kada prođu kroz endotelnu barijeru i migriraju u subendotelni prostor, odnosno u novonastali sloj neointime, monociti se diferenciraju u makrofage. Makrofagi zatim putem svojih receptora vezuju preostale oksidovanog LDL, što dovodi do transformacije monocita u penaste ćelije. Ovaj proces dodatno pojačava aktivaciju endotela, ali se takođe regrutuju i leukociti pomoću TNF- α koga makrofagi sekretuju (Steinl i Kaufmann, 2015; Zhu i sar., 2018). Dalje dolazi do rasta i razvoja aterosklerotskog plaka preko aktivacije novih monocita, ali i uključivanja drugih tipova ćelija, poput glatkih mišićnih ćelija krvnog suda. Povećanje zapremine fibromuskularnog plaka izaziva lokalnu hipoksiju, zbog čega se pokreće proces neovaskularizacije (slika 1.6). Sa druge strane, inflamacija endotela, osim monocita i drugih leukocita, takođe stimuliše aktivaciju i akumulaciju trombocita (Steinl i Kaufmann, 2015). Naime, pri oštećenju endotela, trombociti u krvi bivaju izloženi vWF poreklom iz oštećenih endotelnih ćelija što dovodi do njihovog vezivanja za površinu plaka (Poston, 2019). Trombociti zakačeni za mesto povrede krvnog suda oslobađaju faktor rasta poreklom iz trombocita (eng. *platelet-derived growth factor*, PDGF) koji predstavlja i mitogen i

hemoatraktant za glatke mišićne ćelije. Pored toga što stimuliše deobu, hiperplaziju i migraciju ovih ćelija na mesto povrede, PDGF dodatno indukuje sekreciju proteina koji ulaze u sastav ECM (Newby, 2000). Ovim procesima se favorizuje patološko vaskularno remodelovanje, odnosno nagomilavanje ECM i formiranje aterosklerotskog plaka (Chistiakov i sar., 2015).

Penaste ćelije dodatno pogoršavaju stanje aterosklerotskog plaka na taj način što sekretuju citokine, faktore rasta, ROS, MMP i dr. Time se ubrzava proces remodelovanja tkiva što neizbežno vodi ka destabilizaciji i pucanju plaka (De Leon i sar., 2015). Pored toga, penaste ćelije vremenom ulaze u proces apoptoze, u unutrašnjosti plaka se nagomilavaju lipidi i ćelijski ostaci i formira se nekrotska lipidna srž (slika 1.6). Pri pucanju plaka, elastin, kolagen, tkivni faktori i drugi molekuli ECM katalizuju proces tromboze (Steinl i Kaufmann, 2015). Krajnja posledica ateroskleroze je formiranje tromba i začepljenje krvnog suda (Gimbrone i García-Cardena, 2016). Paradoks u procesu formiranja tromba predstavlja dvojaka uloga MMP u poodmaklim stadijumima ateroskleroze. Naime, MMP vrše proteolitičku degradaciju komponenti ECM endotela čime stimulišu rast i migraciju glatkih mišićnih ćelija, odnosno doprinose daljem razvoju plaka. Sa druge strane, upravo degradacija ECM omogućava dodatnu akumulaciju makrofaga, odnosno debljanje plaka, a samim tim i njegovu destabilizaciju i pucanje (Johnson, 2017).

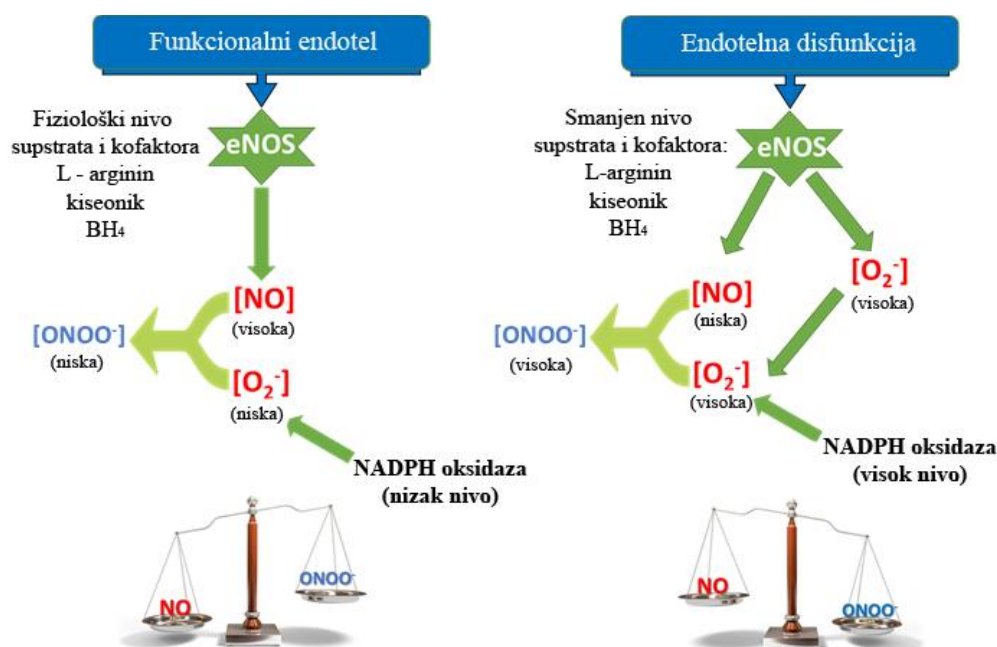


Slika 1.6. Proces nastanka i razvoja ateroskleroze. ICAM-1 – međucelijski adhezivni molekul-1; IL – interleukin; LDL – lipoproteini male gustine; MCP-1 – protein hemoatraktant za monocite-1; MMP – matriksna metaloproteinaza; ROS – reaktivne vrste kiseonika; TGF- β – transformišući faktor rasta- β ; VCAM-1 – molekul adhezije vaskularnih ćelija-1. Preuzeto iz Wilck i Ludwig (2014).

1.2.1. Uloga azot-monoksida u endotelnoj disfunkciji i aterosklerozi

Smatra se da je u osnovi endotelne disfunkcije gubitak vazoprotektivnog efekta NO usled pojave oksidativnog stresa u endotelnim ćelijama koji snižava nivo NO. Promene u stvaranju i bioraspoloživosti NO se dovode u vezu sa vaskularnim poremećajima poput hipertenzije i ateroskleroze (Zhao i sar., 2015). Uzroci deficita NO mogu biti njegova transformacija u druge oblike i prestanak sinteze NO u endotelu. Gubitak raspoloživog NO je prisutan u inflamaciji gde se

NO troši tako što reaguje sa ROS koje nastaju enzimskim delovanjem nikotinamidadeninindukleotid-fosfat (NADPH) oksidaza u stanju oksidativnog stresa. Posebno je važno reagovanje NO sa superoksid anjon radikalom ($O_2^{\bullet-}$), pri čemu nastaju peroksinitritni anjoni ($ONOO^-$) koji uzrokuju nitraciju, oksidativna oštećenja i S-nitrozilaciju molekula DNK, lipida i proteina (Förstermann i Sessa, 2012; Cyr i sar., 2020). Pored toga, efekat $ONOO^-$ se ogleda i u tome što predstavlja medijator u oksidaciji LDL, čime pojačava proaterogenu ulogu lipoproteina. Pored toga, $ONOO^-$ učestvuje i u oksidaciji tetrahydrobiopterina (BH_4) koji je važan kofaktor u sintezi NO, čime dolazi do promene u aktivnosti eNOS, enzima odgovornog za sintezu NO u endotelnim ćelijama, i posledičnog razdvajanja na monomere (eng. *uncoupling*) (Endemann i Schiffrin, 2004). Ukoliko se dimer eNOS razdvoji na dva monomera, nastali enzimski monomer dobija funkciju slabe NADPH oksidaze, te umesto NO produkuje $O_2^{\bullet-}$. Time se, osim što se smanjuje sinteza NO i njegovo protektivno delovanje u vaskulaturi, takođe dodatno nakupljaju ROS. Sintetisani $O_2^{\bullet-}$ će dalje razdvajati dimere eNOS enzima, čime se dodatno pospešuje inflamacija i degradacija endotela (Cyr i sar., 2020) usled oksidativnog stresa, što posledično vodi ka oštećenju endotelne ćelije i pojavi endotelne disfunkcije (Förstermann i Münzel, 2006) (slika 1.7).



Slika 1.7. Šematski prikaz uloge endotelne azot-monoksid sintaze, azot-monoksida i reaktivnih vrsta kiseonika u očuvanju normalne funkcije endotela, kao i nastanku endotelne disfunkcije. eNOS – endotelna azot-monoksid sintaza; NADPH – nikotinamidadeninindukleotid-fosfat; NO – azot-monoksid; $ONOO^-$ – peroksinitrit; $O_2^{\bullet-}$ – superoksid anjon radikal; ROS – reaktivne vrste kiseonika. Preuzeto uz modifikacije iz Dawoud i Malinski (2018).

ROS imaju izuzetnu ulogu u fiziologiji i patofiziologiji endotela. Naime, aktivacija endotela, između ostalog, podrazumeva isključivanje zaštitnih funkcija NO i prelazak na redoks signalne procese, odnosno pojačanu sintezu ROS. $O_2^{\bullet-}$ u prisustvu enzima superoksid dismutaze gradi vodonik peroksid koji lako difunduje kroz ćeliju i reaguje sa ostacima cisteina proteina. ROS su odgovorne za fosforilaciju transkripcionih faktora, remodelovanje hromatinske strukture, aktivaciju transkripcije, aktivaciju proteaza i dr. Kao što je rečeno, razdvojeni monomeri eNOS pospešuju sintezu ROS. Aktivacija endotela i prelazak na redoks signalnu regulaciju predstavlja fiziološku pojavu u odbrani od patogena. Međutim, hronična produkcija ROS može da premaši ćelijske antioksidativne mehanizme, što doprinosi konstantnoj aktivaciji endotela i posledično vaskularnim bolestima. Štetna aktivacija endotela može biti posledica prirode, trajanja, intenziteta ili kombinacije proinflamacijskih stimulusa, hipoksije ili hroničnih oboljenja poput dijabetesa tipa 2. Aktivacija signalnih puteva posredovanih ROS može biti pokrenuta akumulacijom LDL,

delovanjem inflamacijskih citokina i faktora rasta, kao i interakcijom endotela sa leukocitima. U svakom slučaju, hronična interakcija ROS i NO predstavlja začarani krug koji vodi ka daljoj aktivaciji endotela, inflamaciji, a može da dovede i do ozbiljnih posledica poput aterogeneze i kliničkih oboljenja (Deanfield i sar., 2007).

Pored toga, smanjeni nivo NO u endotelnim ćelijama može da aktivira MMP, konkretno MMP-2 i MMP-9. Usled povećane aktivnosti ovih enzima degradiraju se komponente ECM, ali takođe i fibrozna kapa u uznapredovalom stadijumu ateroskleroze, što uzrokuje pucanje aterosklerotskog plaka (Endemann i Schiffrin, 2004). Kao što je ranije naglašeno, u slučaju nestabilnog plaka, njegova ruptura i oslobađanje u cirkulaciju aktivira proces agregacije trombocita i koagulaciju, što dovodi do formiranja tromba, koji dovodi do začepljenja koronarnih i cerebralnih krvnih sudova i može da izazove infarkt miokarda ili moždani udar.

1.2.2. Uloga čvrstih međućelijskih veza u endotelnoj disfunkciji i aterosklerozi

Poznato je da su veze između endotelnih ćelija podložne dinamičkom remodelovanju kao odgovor na brojne spoljašnje faktore i patološka stanja, pa tako proinflamacijski faktori kao što su trombin, histamin i TNF- α povećavaju propustljivost, dok antiinflamacijski molekuli kao što su sfingozin 1-fosfat (eng. *sphingosine 1-phosphate*, S1P) i angiopoetin-1 smanjuju propustljivost endotela (Cerutti i Ridley, 2017). Jedan od najznačajnijih koraka u aktivaciji endotelnih ćelija je upravo povećana permeabilnost endotela do koje dolazi usled promena u ekspresiji, distribuciji, strukturi ili aktivaciji TJ između endotelnih ćelija. Brojni stimulusi (npr. neurotransmiteri, citokini, toksini, lekovi, nanočestice i dr.) i patološka stanja (npr. ishemija, hipoksija, kao i prisustvo ROS, proteolitičkih enzima i dr.) mogu da utiču na integritet endotela na taj način što: (i) povećavaju ili smanjuju nivo proteina koji ulaze u sastav TJ; (ii) utiču na nepravilnu lokalizaciju molekula u sastavu TJ; i (iii) fosforilišu ili defosforilišu proteine u sastavu TJ (González-Mariscal i sar., 2008). Narušavanje normalne arhitekture TJ za posledicu ima promene u propustljivosti endotelne barijere, s obzirom na to da dolazi do povećanog prolaska tečnosti, makromolekula i ćelija između endotelnih ćelija u subendotelni prostor i dalje u tkiva, što za posledicu ima narušavanje vaskularne homeostaze, i sledstvenog razvoja mnogih vaskularnih bolesti i patoloških stanja (Cong i Kong, 2020). Kao što je napomenuto, patološko stanje koje se nalazi u osnovi mnogih KVB je ateroskleroza, koja nastaje usled aktivacije i poremećaja normalne funkcije endotelnih ćelija.

Čvrste međućelijske veze izgrađene od transmembranskih proteina poput ZO-1 i okcludina omogućavaju endotelu da funkcioniše kao snažna barijera između cirkulacije i ostalih tkiva. Međutim, povreda krvnog suda narušava integritet ovih veza, što dalje vodi ka inflamaciji tkiva i aktivaciji endotela (Fisher, 2008). Naime, bilo kakva promena u normalnoj fiziologiji krvnog suda poput akumulacije oksidovanih LDL, prisustva patogena, oštećenja krvnog suda i poremećaja u krovotoku dovodi do aktivacije endotela. To podrazumeva indukciju signalnog puta nukleusnog faktora- κ B (eng. *nuclear factor-kappa B*, NF- κ B) i sintezu citokina poput TNF- α i MCP-1, što posledično vodi ka povećanoj sintezi ICAM-1 i VCAM-1, kao i povećanoj aktivnosti i redistribuciji JAM i drugih adhezivnih molekula, čime se narušava integritet TJ (pregledni rad Sluiter i sar., 2021). Kadherinske veze se takođe narušavaju ili potpuno raskidaju, kadherini se zatim internalizuju sa membrane u citosol, a vremenom u citosolu i degradiraju. Posledica ovih usko povezanih procesa je povećana vaskularna permeabilnost i povećana transendotelna migracija monocita (pregledni rad Sluiter i sar., 2021), što dalje inicira kaskadu događaja koja je prethodno detaljno opisana u poglavlju 1.2.

1.2.3. Uloga ćelijskih adhezivnih molekula u endotelnoj disfunkciji i aterosklerozi

U patofiziološkom odgovoru endotela aktiviraju se plejotropni transkripcioni faktori koji pokreću ekspresiju gena koji kodiraju razne patofiziološke efektorne proteine poput prokoagulacijskih molekula kao što su VCAM-1, ICAM-1 i E-selektin (Gimbrone i García-Cardena, 2016). Pored toga, ROS se sve više nakupljaju u endotelnim ćelijama, što dodatno pospešuje hemoatrakciju i vezivanje putem aktiviranja MCP-1, ICAM-1 i VCAM-1 (Endemann i Schiffrin, 2004). Navedeni proteini zajedno indukuju lokalni proinflamacijski fenotip endotela.

VCAM-1 predstavlja ključni element pomoću koga vaskularni endotel reaguje na inflamaciju i disbalans, što prethodi procesu aterogeneze. Naime, VCAM-1 selektivno vezuje limfocite i monocite zbog toga što oni ekspimiraju njemu kompatibilni receptor antigen-4. Ekspresija VCAM-1 je indukovana upravo u endotelnim ćelijama usled narušavanja integriteta endotela, što prethodi ranom regrutovanju monocita u stvaranju aterosklerotskih lezija. Prostorna ekspresija ovog proteina ukazuje na to da je najviše lokalizovan u regionima vaskularnog sistema najpodložnijim formiranju lezija (Gimbrone i García-Cardena, 2016). ICAM-1 takođe učestvuje u adheziji monocita tako što vezuje $\beta 2$ integrin ovih ćelija (Newby, 2000). Koncentracija oslobođenih molekula VCAM-1 i ICAM-1 u plazmi je u koleraciji sa stadijumom oštećenja endotela, odnosno kasnije sa veličinom lezija kod pacijenata sa aterosklerozom (Newby, 2000; Gimbrone i García-Cardena, 2016). PECAM-1 takođe doprinosi vezivanju ćelija iz krvi i formiranju plaka (Fisher, 2008). Pored navedenih molekula adhezije, L-, P- i E-selektini i lektini C tipa takođe učestvuju u privlačenju, adheziji i kotrljanju monocita, što prethodi transendotelnoj migraciji ovih ćelija u subendotelni prostor (Čejková i sar., 2016).

Svi navedeni aspekti odgovora disfunkcionalnog endotela na hroničnu inflamaciju vode ka zadebljanju intime, odnosno stvaranju neointime, što je još jedan od ključnih koraka u nastanku aterosklerotskih promena u krvnom sudu (Newby, 2000; Clowes, 2006).

1.2.4. Angiogeneza u aterosklerozi

Prekomerna angiogeneza se javlja u mnogim patološkim stanjima kao što su rast, progresija i metastaza tumora (Hida i sar., 2018), ali i kod brojnih nemalignih oboljenja poput dijabetesa, psorijaze, reumatoidnog artritisa, proliferativne retinopatije, sistemskog eritematoznog lupusa (Carmeliet i sar., 2003; Felmeden i sar., 2003; Lee i sar., 2021), širenja adipoznog tkiva i nastanka gojaznosti (Rutkowski i sar., 2009; Lemoine i sar., 2013) i dr. Sa druge strane, neadekvatan rast ili održavanje integriteta krvnih sudova može dovesti do nastanka rana koje teško zarastaju i ishemijskih bolesti poput infarkta miokarda i moždanog udara (Kotlinowski i Jozkowicz, 2016).

U kardiovaskularnom sistemu nastanak novih krvnih sudova ima važnu ulogu u restenozu nakon angioplastičnog zahvata, inflamaciji u aterosklerotskim plakovima i hipertrofiji leve komore usled kontinuiranog opterećenja (Simons, 2005). Smatra se da angiogeneza u aterosklerotskom plaku ima veliku ulogu u samom nastanku plaka, krvarenju unutar plaka, njegovoj destabilizaciji i, u krajnjem slučaju, tromboembolijskim događajima (Moreno i sar., 2006; Parma i sar., 2017). Te sumnje su potvrdila eksperimentalna istraživanja na životinjama. Studije na miševima su ukazale na to da angiogeneza može da uzrokuje aterosklerozu. Takođe je pokazano da VEGF stimuliše aterosklerozu kod miševa i zečeva, dok inhibitori angiogeneze usporavaju razvoj plaka kod miševa i svinja (pregledni radovi Khurana i sar., 2005; Camaré i sar., 2017). U prilog tome ide i činjenica da u aterosklerotskom plaku dolazi do lokalne hipoksije usled inflamacije i zadebljanja intime. Hipoksija i inflamacija stimulišu angiogenezu iz *vasa vasorum* koji se nalaze u *tunica adventitia*, čime se plak opskrbljuje hranljivim materijama i kiseonikom, i posledično dalje razvija (pregledni rad Camaré i sar., 2017). Moreno i saradnici (2006) su u svom preglednom radu izveli zaključak da se neovaskularizacija intime veoma retko dešava bez prethodnog prisustva ateroskleroze, što ukazuje na to da se aterosklerotske promene prve javljaju i da one zatim pokreću angiogenezu. Ipak,

autori su naveli da je studija na svinjama pokazala da je stvaranje novih krvnih sudova započelo pre endotelne disfunkcije, što ukazuje na to da angiogeneza potencijalno može da ima važnu ulogu u ranom stadijumu aterogeneze. Nasuprot tome, stvaranje novih krvnih sudova može da dovede i do regresije plaka zbog odnošenja lipoproteina iz intime u krvotok (Moreno i sar., 2006).

Uzročno-posledični odnos između angiogeneze i ateroskleroze je u većem broju studija ispitivan na životinjskim modelima, dok je broj studija koje opisuju ove procese u organizmu čoveka ograničen. Smatra se da u aterosklerozi kod ljudi angiogeneza potiče iz *tunica adventitia* i da je okidač za to gradijent VEGF, mada je uočena mogućnost da do angiogeneze dolazi i sa strane lumena krvnog suda (Parma i sar., 2017). Upravo zbog toga je angiogeneza iz *vasa vasorum* ispitivana u terapeutske svrhe. Naime, na miševima je pokazano da antiproliferacijski i antiinflamacijski lekovi značajno smanjuju neovaskularizaciju *vasa vasorum* i usporavaju napredovanje aterosklerotskih lezija (Langheinrich i sar., 2009). Međutim, zaključcima Parma i saradnika (2017) ne ide u prilog činjenica da je nekoliko kliničkih studija pokazalo da VEGF, kada se primeni u svrhu lečenja ishemijske bolesti srca i bolesti perifernih arterija, predstavlja sasvim bezbedan terapijski pristup bez ikakvih indikacija da pokreće ili pospešuje razvoj ateroskleroze (pregledni rad Khurana i sar., 2005).

Pored do sada opisanih klasičnih proangiogenih i antiangiogenih faktora, poslednjih godina se pojavila ideja da različite hemikalije iz radnog i životnog okruženja mogu da utiču na nastanak i razvoj novih krvnih sudova, čime doprinose brojnim patološkim stanjima povezanim sa neovaskularizacijom. Tako je pokazano da nikotin, arsen, bisfenol A, dioksin, trimetiltin-hlorid, perfluorooktansulfonska kiselina i druge hemikalije (pregledni rad Hu i sar., 2015), toksični metali poput kadmijuma (Wei i sar., 2017) i olova (Machoń-Grecka i sar., 2022), agonisti arilhidrokarbonskog receptora (Tsai i sar., 2015) i polihlorovani bifenili (Kalkunte i sar., 2017) mogu da stimulišu ili inhibišu angiogenezu. Iako je mnogo truda uloženo u ispitivanje angiogeneze u kontekstu ateroskleroze, kako u životinjskim modelima, tako i u kliničkim studijama, očigledna je potreba za novim studijama. Pre svega, za sada se ne zna mnogo o efektima dugotrajnog izlaganja različitim hemikalijama iz radnog i životnog okruženja na angiogenezu u uslovima *in vitro*, te se uočava jasna potreba za novim istraživanjima kako bi se ispitao uticaj ovakvog izlaganja na sposobnost formiranja novih krvnih sudova što može imati značajne patofiziološke posledice.

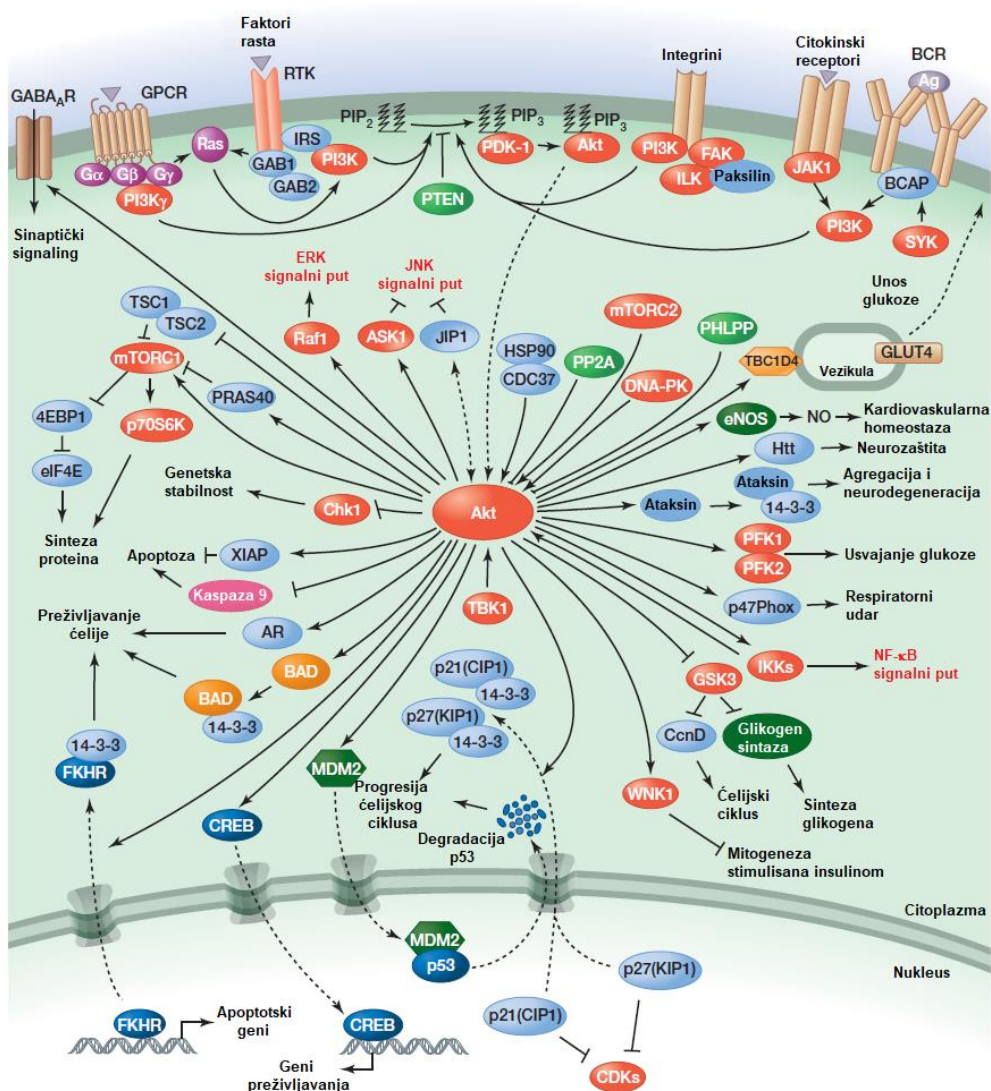
1.3. Signalni mehanizmi u endotelnim ćelijama

1.3.1. Signalni put fosfatidilinozitol 3-kinaze – protein kinaze B/Akt

Akt (protein kinaza B, PKB) i fosfatidilinozitol 3-kinaza (eng. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K) su ključni proteini koji čine tzv. PI3K/Akt signalni put, ili kraće Akt signalni put. Akt signalna kaskada se aktivira preko receptora sa aktivnošću tirozin kinaze (eng. *receptor tyrosine kinase*, RTK), integrina, TCR i BCR (receptora B i T limfocita), citokinskih receptora i drugih receptora spregnutih sa proteinom G (eng. *G protein-coupled receptors*, GPCR) i dr. (Haynes i sar., 2000; Hwang i sar., 2011; Hemmings i Restuccia, 2012). Vezivanje liganda za odgovarajuće receptore na površini ćelije dovodi do fosforilacije tirozinskih ostataka samih receptora ili njihovih supstrata, za koje „pristaje“ PI3K zahvaljujući SH2 domenima (eng. *Src Homolog 2*) regulatorne subjedinice p85. Aktivacijom katalitičkog domena p110, PI3K prevodi fosfatidilinozitol (3,4)-bifosfat (eng. *phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate*, PIP₂) u fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfat (eng. *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*, PIP₃), koji regrutuje serin/treonin kinazu Akt/PKB u membranu gde je fosforiliše kinaza zavisna od fosfoinozitida (eng. *phosphoinositide-dependent kinase-1*, PDK-1) (Hemmings i Restuccia, 2012). Akt se fosforiliše na dva ključna aminokiselinska ostatka: Thr308 u tzv. T-petlji katalitičkog centra i Ser473 u hidrofobnom delu na C kraju. Za maksimalnu aktivaciju kinaze Akt neophodna je fosforilacija oba ostatka (Manning i Toker, 2017). Ovako aktivirana Akt zatim fosforiliše više od 100 različitih proteina u ćelijama, te na taj način

aktivira brojne nishodne ćelijske odgovore, uključujući preživljavanje, apoptozu, rast i proliferaciju ćelija, adheziju i migraciju ćelija, angiogenezu, kao i metabolizam. Ovaj signalni put je visoko konzerviran u svim ćelijama viših eukariota (Morello i sar., 2008).

Sisarske ćelije karakteriše ekspresija tri različite izoforme Akt: Akt1, Akt2 i Akt3, kodirane različitim genima. Za izoforme Akt značajna su funkcijska preklapanja, jer delecije oba gena *Akt1* i *Akt2* kod miševa dovode do ozbiljnog zastoja rasta i do višestrukih oštećenja u razvoju, koja dovode do perinatalnog letaliteta (Peng i sar., 2003). Eksperimentima na miševima kod kojih je genetičkom manipulacijom uklonjen gen koji kodira određenu specifičnu izoformu Akt (eng. *Akt1*, *Akt2* i *Akt3 null mice*) pokazano je da ove izoforme imaju različite fiziološke uloge i/ili su eksprimirane u različitim tipovima ćelija (Somanath i sar., 2006). Signalizacija preko Akt u ćelijama je regulisana preko većeg broja različitih mehanizama koji često podrazumevaju i interakciju (eng. *cross-talk*) sa drugim signalnim putevima (pregledni rad Manning i Toker, 2017). Deregulacija signalnog puta PI3K/Akt se dovodi u vezu sa čitavim nizom patoloških stanja i bolesti kod ljudi, uključujući kancer, dijabetes, KVB, autoimunska i neurološka oboljenja (pregledni rad Manning i Toker, 2017).



Slika 1.8. Šematski prikaz signalnog puta fosfatidilinozitol 3-kinaze – protein kinaze B/Akt. Akt – protein kinaza B; BCR – receptor B limfocita; GABA_AR – receptor za γ -aminobutirat, tip A; GPCR – receptor spregnut sa proteinom G; PDK1 – kinaza zavisna od fosfoinozitida; PIP₂ – fosfatidilinozitol (3,4)-bifosfat; PIP₃ – fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfat; PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza; RTK – receptor sa aktivnošću tirozin kinaze; TNF- α – faktor nekroze tumora α ; VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta. Preuzeto iz Hemmings i Restuccia (2012).

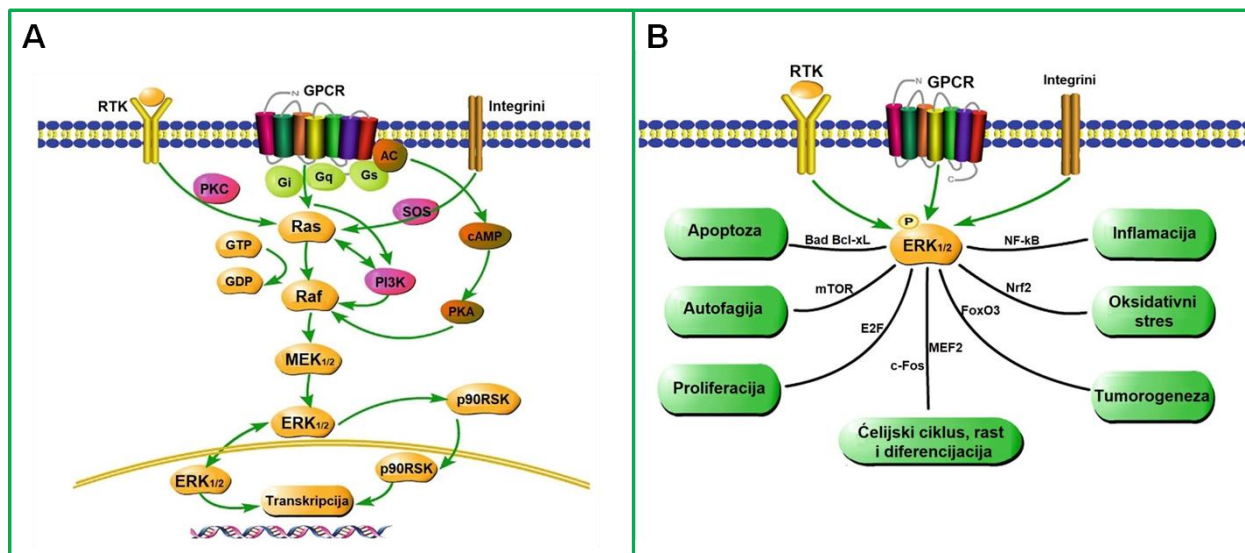
Kada su u pitanju KVB i vaskularne patologije, brojni dokazi ukazuju na važnu ulogu koju signalni put Akt ima u endotelnim ćelijama, vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama i makrofagima. Akt1 je najznačajnija i najzastupljenija izoforma u endotelnim ćelijama. Poznato je da aktivacija Akt u endotelnim ćelijama započinje aktivacijom PI3K nizvodno od većeg broja receptora na površini ćelija kao što su GPCR (npr. hemokinski receptori), RTK (npr. insulinski receptor i receptor za VEGF), integrini i citokinski receptori (npr. receptor za TNF- α) (slika 1.8).

Pored učešća navedenih receptora u aktivaciji kaskade Akt, ovaj signalni put se u endotelnim ćelijama aktivira pomoću drugih stimulusa kao što su PDGF, EGF, bazni faktor rasta fibroblasta (eng. *basic fibroblast growth factor*, bFGF), S1P, faktor rasta sličan insulinu-1 (eng. *insulin-like growth factor*, IGF-1) ili hemodinamske sile krvotoka (Morello i sar., 2008). Većina ovih liganada se vezuje za određeni receptor na površini endotelne ćelije (najčešće GPCR ili RTK), dok hemodinamske promene detektuju mehanosenzorni receptori poput PECAM1, VEGFR2, PAR1 (eng. *proteinase-activated receptor 1*, F2R), kadherina, integrina, laminina, jonskih kanala i dr. (Loufrani i sar., 2008; Béguin i sar., 2020). Dodatno, neki inhibitori fosfataza takođe aktiviraju Akt (Alessi i sar., 1996), dok ROS aktiviraju Akt preko angiotenzina II (Ushio-Fukai i sar., 1999). Ovi faktori regulišu aktivnost Akt preko transkripcionih ili posttranslacionih mehanizama. Poznato je da aktivacija Akt1 preko VEGF stimuliše proliferaciju, migraciju i preživljavanje endotelnih ćelija (Chen i sar., 2005). Ova zapažanja su u skladu sa podatkom da je eNOS, koji je odgovoran za kontrolu vaskularnog tona, supstrat za Akt1 u endotelnim ćelijama (Lee i sar., 2014a). Akt reguliše aktivnost eNOS preko fosforilacije ostatka Ser1177, što dovodi do povećanog stvaranja NO i posledične relaksacije glatkih mišićnih ćelija, vazodilatacije i snižavanja krvnog pritiska. Ekspresija aktivnog alela Akt1 u endotelnim ćelijama sprečava formiranje lezija u neointimi nakon povrede arterijskog krvnog suda (Mukai i sar., 2006) i indukuje patološku angiogenezu uz istovremeno povećanje vaskularne permeabilnosti (Phung i sar., 2006). Kao što je ranije napomenuto, angiogeneza je od izuzetne važnosti za pojedine fiziološke procese, pa tako ima ulogu tokom embrionalnog razvoja i remodelovanja tkiva, ali je istovremeno od značaja i u patološkim stanjima poput razvoja tumora. Za ćelije tumora je karakteristično da rastu i proliferišu u uslovima smanjene dostupnosti kiseonika i hranljivih materija, pa je stvaranje novih krvnih sudova od esencijalne važnosti za dalju progresiju tumora. Signalizacija preko proteina Akt u endotelnim ćelijama ima važnu ulogu u procesu angiogeneze. Akt se aktivira pod delovanjem VEGF, što za posledicu ima inhibiciju apoptoze i stimulaciju ćelijskog rasta i preživljavanja i posledično stvaranje novih krvnih sudova. Akt učestvuje u procesu angiogeneze i preko stimulacije aktivnosti eNOS da proizvodi NO u većim količinama, koji zatim stimuliše vazodilataciju i vaskularno remodelovanje (Manning i Cantley, 2007).

1.3.2. Signalni put kinaza aktiviranih mitogenima

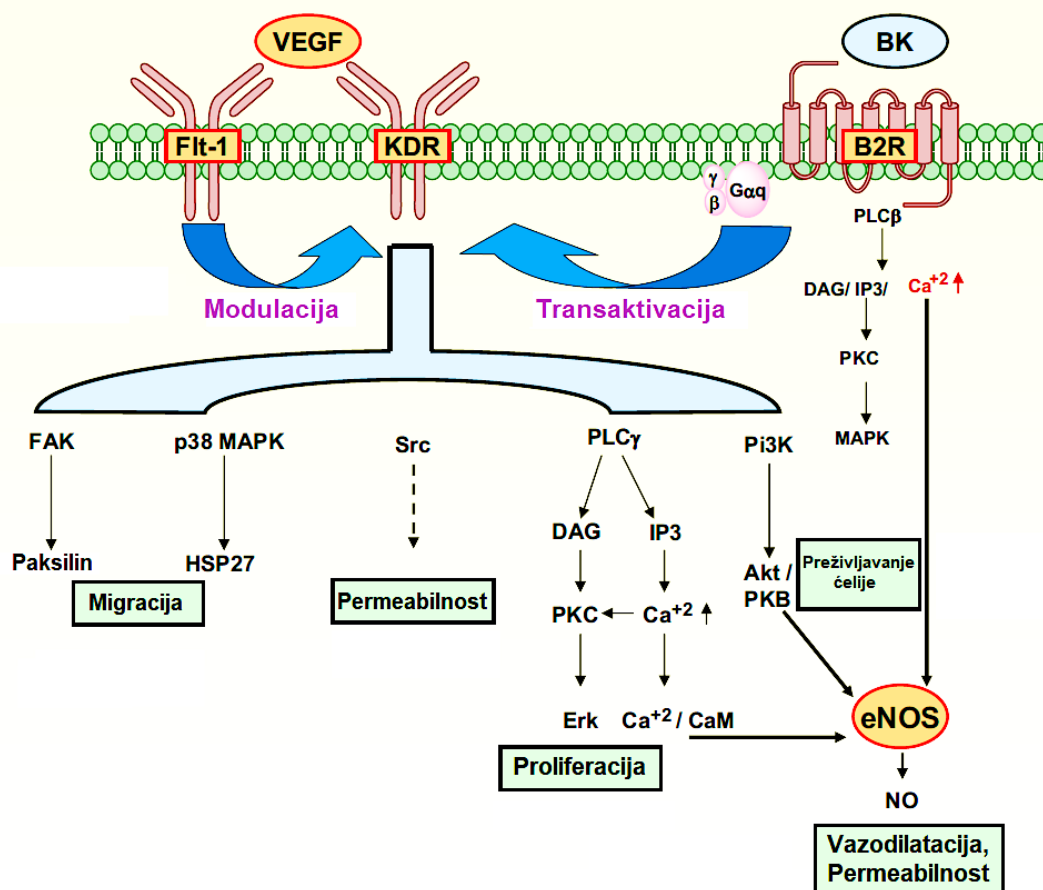
Familija protein kinaza aktiviranih mitogenima (eng. *mitogen-activated protein kinases*, MAPK) ima visoko konzervirane funkcije u svim ćelijama eukariota. Kod sisara postoje četiri glavne signalne kaskade MAPK: kinaze regulisane vanćelijskim signalima 1 i 2 (eng. *extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2*, ERK1/2), c-Jun N-terminalna kinaza (JNK), p38 MAPK i ERK5/BMK1 (Kyriakis i Avruch, 2001; Keshet i Seger, 2010). ERK1/2 uglavnom aktiviraju različiti mitogeni stimulusi poput faktora rasta i hormona, dok JNK i p38 u najvećoj meri aktiviraju stresorni stimulusi, te se zbog toga često nazivaju i stres kinaze (Kyriakis i Avruch, 2001). Druge atipične MAPK poput ERK3/4, NLK i ERK7 su istraživane u manjoj meri (Coulombe i Meloche, 2007). Signalni put MAPK učestvuje u regulaciji različitih procesa, uključujući adheziju i migraciju ćelija, progresiju kroz ćelijski ciklus, preživljavanje, diferencijaciju, metabolizam, proliferaciju i transkripciju (Rubinfeld i Seger, 2005).

Signalna kaskada ERK1/2 je jedan od najvažnijih i najviše proučavanih signalnih puteva u ćeliji (slika 1.9A). Predstavlja put prenosa informacija od receptora na površini ćelije do DNK u jedru, čime je omogućena koordinacija i integracija odgovora na različite stimulse. Ovi stimulusi uključuju hormone, faktore rasta, citokine, ROS i dr. (Mebratu i Tesfaigzi, 2009; Plotnikov i sar., 2011). Navedeni ligandi aktiviraju različite receptore na površini ćelija, poput RTK, koje dimerizuju i unakrsno fosforilišu tirozinske ostatke, za koje „pristaje“ Grb2 (eng. *growth factor receptor-bound protein 2*) zahvaljujući svojim SH2 domenima i zatim regrutuje, posredstvom svojih SH3 domena, izmenjivač guaninskih nukleotida SOS (eng. *son of sevenless*). Izmenom guaninskog nukleotida GDP za GTP aktivira se mali protein G Ras, koji zatim nizvodno aktivira serin/treonin kinazu Raf ili MAPKKK, kinazu kinaze MAPK kinaze (MAPKK). Aktiviran Raf dalje fosforiliše serin/tirozin/treonin kinazu MAPK kinaze, odnosno MAPKK ili MEK1/2, a ona potom MAPK, u ovom slučaju ERK1/2 (Mebratu i Tesfaigzi, 2009; Wortzel i Seger, 2011). Aktiviran ERK1/2 fosforiliše serinske ili treoninske ostatke nishodnih proteina, što dovodi do njihove aktivacije. Do sada je poznato nekoliko stotina različitih supstrata ERK1/2 poput drugih kinaza, elemenata citoskeleta i transkripcionih faktora. Procenjeno je da je signalna kaskada ERK1/2 zadužena za fosforilaciju više od 500 različitih proteina unutar ćelije (Wortzel i Seger, 2011). Pojedini supstrati za kinazu ERK1/2 se nalaze u citosolu, dok se ostali fosforilišu unutar jedra (Zassadowski i sar., 2012). ERK1/2 u jedru fosforiliše i aktivira čitav niz transkripcionih faktora, poput mTOR, FoxO3, Nrf2, Elk-1, c-Fos, p53, AP-1, Ets1/2, CEBP, myc i c-Jun koji su važni za inicijaciju i regulaciju proliferacije, autofagije, oksidativnog stresa, onkogene transformacije i dr. Sa druge strane, do sada je identifikovan i veliki broj citosolnih supstrata, uključujući fosfoprotein fosfataze, RSK familiju protein kinaza, fosfodiesteraza cikličnih adenozin monofosfata (PDE4), citosolnu fosfolipazu A₂, proteine u sastavu citoskeleta, proteine koji su uključeni u proces apoptoze, kao i regulatorne i signalne molekule (Yoon i Seger, 2006; Roskoski, 2012; Kong i sar., 2019). ERK1/2 putem tih proteina poput drugih kinaza, elemenata citoskeleta i transkripcionih faktora utiče na ćelijske procese poput apoptoze, autofagije, proliferacije, ćelijski ciklus, rast i druge (Kong i sar., 2019) (slika 1.9B).



Slika 1.9. Šematski prikazi (A) signalnih puteva kinaze aktiviranih mitogenima ERK1/2 i (B) ćelijskih funkcija u kojima je uključen ERK1/2 signalni put. AC – adenilil ciklaza; cAMP – ciklični adenozin-monofosfat; ERK1/2 – kinaza regulisana vanćelijskim signalima 1 i 2; GDP – guanozin-difosfat; Gi, Gq, Gs – G proteini; GPCR – receptor spregnut sa proteinom G; GTP – guanozin-trifosfat; MEK2 – faktor pojačivač miocita 2; MEK1/2 – MAPKK, serin/tirozin/treonin kinaza MAPK kinaze; mTOR – meta rapamicina kod sisara; NF-κB - nukleusni faktor-κB; p90RSK – ribozomalna S6 kinaza od 90 kDa; PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza; PKA – protein kinaza A; PKC – protein kinaza C; Raf – MAPKKK, kinaza kinaze MAPK kinaze (MAPKK); Ras – hidrolaza GTP; RTK – receptor sa aktivnošću tirozin kinaze. Preuzeto uz modifikacije iz Kong i saradnici (2019).

S obzirom na to da signalni put ERK1/2 ima ulogu u proliferaciji, diferencijaciji i preživljavanju ćelija, ne iznenađuje činjenica da je upravo deregulacija ovog signalnog puta česta u različitim malignim oboljenjima. Tako je potvrđeno da se promene u ćelijskoj signalizaciji na nivou kaskade ERK1/2 javljaju kod približno jedne trećine svih humanih kancera (Dhillon i sar., 2007). Pored kancera, deregulacija signalnog puta ERK1/2 je potvrđena i kod drugih patoloških stanja, kao što su Hantingtonova bolest (Bodai i Marsh, 2012), akutne i hronične bolesti bubrega (pregledni rad Feliers i Kasinath, 2011), neurodegenerativna oboljenja poput Alchajmerove bolesti, Parkinsonove bolesti i amiotrofne lateralne skleroze (Kim i Choi, 2010), kao i u različitim stadijumima razvoja KVB, poput hipertrofične kardiomiopatije, dilatacijske kardiomiopatije i povreda nastalih usled ishemije/reperfuzije (pregledni rad Wang, 2007).



Slika 1.10. Šematski prikaz signalnog puta vaskularnog endotelnog faktora rasta preko kog se u endotelnim ćelijama aktivira signalizacija PI3K/Akt i ERK1/2 i posledično endotelna azot-monoksid sintaza. Akt/PKB – protein kinaza B; BK – bradikinin; B2R – bradikininiski receptor B2; CaM – kalmodulin; DAG – diacilglicerol; eNOS – endotelna azot-monoksida sintaza; Erk – kinaza regulisana vanćelijskim signalima; FAK – fokalna protein kinaza povezana sa adhezijom; HSP27 – protein toplotnog šoka 27; IP3 – inozitol (1,4,5)-trifosfat; MAPK – kinaza aktivirana mitogenima; NO – azot-monoksid; PKC – protein kinaza C; PLC – fosfolipaza C; VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta. Preuzeto uz modifikacije iz Valdés i saradnici (2008).

Studijama na miševima je pokazano da poremećaji u aktivaciji endotelnih ćelija pod delovanjem različitih faktora rasta poput VEGF i bFGF dovode do smanjene aktivacije signalnog puta MAPK/ERK i gubitka vaskularnog integriteta i propadanja krvnih sudova (Lee i sar., 2007; Murakami i sar., 2008). VEGF je najznačajni faktor rasta koji ispoljava svoje delovanje na nivou endotela (Ricard i sar., 2019). Vezivanje VEGF za VEGFR-2 dovodi do snažne aktivacije signalnog puta ERK1/2 (slika 1.10), dok inhibicija VEGFR-2 signalizacije dovodi do gotovo potpune supresije ERK1/2 i mortaliteta tokom ranog embrionalnog razvoja kod laboratorijskih životinja (Simons i sar., 2016). Izoforme ERK1 i ERK2 odlikuje preko 80% homologije u sekvenci

aminokiselina, a obe izoforme su eksprimirane u endotelnim ćelijama (Ricard i sar., 2019). Miševi sa globalnom delecijom *Erk1* su vijabilni, fertilni i nemaju određeni vaskularni fenotip (Pagès i sar., 1999). Globalna delecija *Erk2* dovodi do letalnog ishoda tokom embrionalnog razvoja usled čitavog niza razvojnih defekata (Hatano i sar., 2003). Endotelno-specifična delecija *Erk2* kod miševa koji imaju globalni *Erk1*^{-/-} genotip je takođe letalna tokom embrionalnog razvoja usled narušene proliferacije i migracije endotelnih ćelija, što negativno utiče na fiziološku angiogenezu (Srinivasan i sar., 2009). Sa druge strane, vezivanjem estradiola (E2) za estrogenski receptor (ER) spregnut sa proteinom G endotelnih ćelija (eng. *G-protein-coupled estrogen receptor*, GPER) aktivira se Src/PI3K/Akt signalni put. Aktivirana Akt sledstveno aktivira ERK, koja zajedno sa Akt fosforiliše ostatak Ser-1177 eNOS, dovodi do povećane sinteze NO koji ima zaštitnu ulogu u endotelnim ćelijama i krvnim sudovima (Wu i sar., 2011).

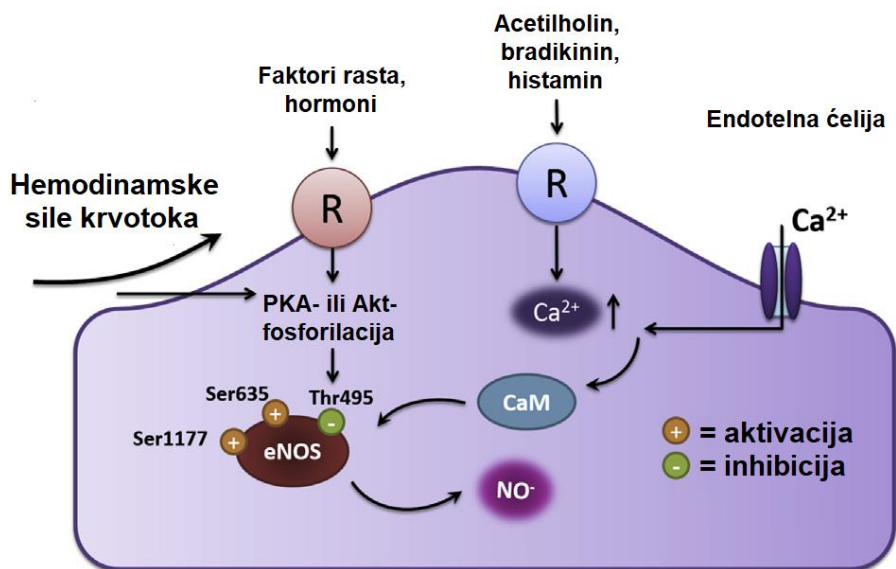
1.3.3. Signalni put endotelna azot-monoksid sintaza – azot-monoksid

Rečeno je već da je NO gas, slobodni radikal (Deanfield i sar., 2007) koji u različitim tipovima ćelija nastaje prilikom oksidacije L-arginina do L-citrulina uz učešće NOS. Postoje tri izoforme NOS: neuronska NOS (nNOS), inducibilna NOS (iNOS) i endotelna NOS (eNOS). Sve tri izoforme su kodirane od strane specifičnih gena, pa je tako nNOS kodirana genom *NOS1*, iNOS genom *NOS2*, dok je eNOS kodiran genom *NOS3*. nNOS je uglavnom eksprimirana u centralnom i perifernom nervnom sistemu, iNOS je uključena u imunski odgovor i uglavnom eksprimirana u makrofagima, dok se eNOS predominantno nalazi u vaskularnom endotelu (Mungrue i sar., 2003).

eNOS predstavlja homodimer. Spajanje dve monomerne jedinice u funkcionalni enzim je regulisano prisustvom mnogih faktora poput kalmomodulina (CaM), koga aktivira Ca²⁺ (Dymkowska i sar., 2019; Cyr i sar., 2020). Sa druge strane, vezivanje kofaktora je neophodno za pravilno funkcionisanje svih NOS enzima. Kofaktori su O₂, NADPH (koji je ujedno i elektron donor), flavinadenindinukleotid (FAD), flavinmononukleotid (FMN) i BH₄ (Förstermann i Sessa, 2012; Cyr i sar., 2020).

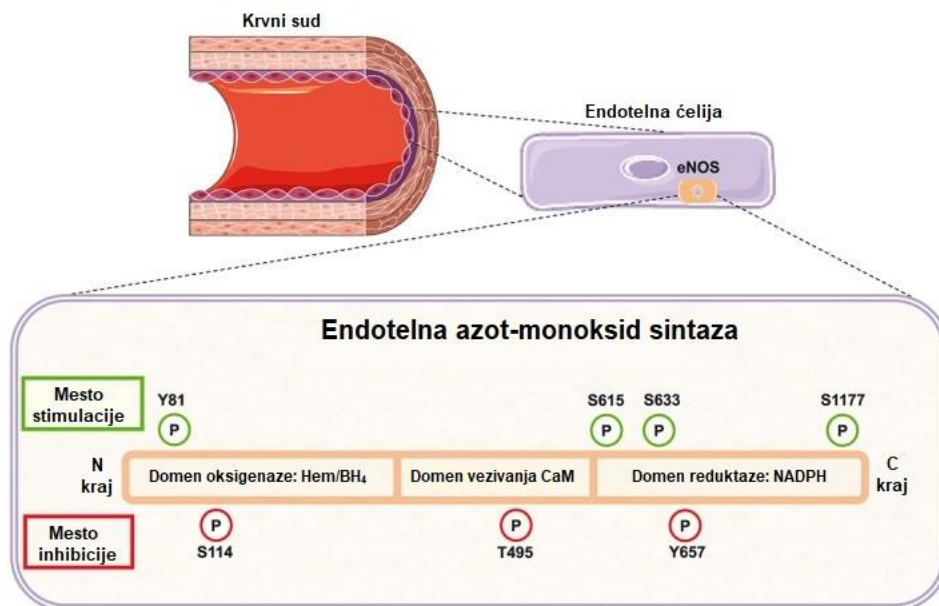
Kao što je ranije pomenuto, endotelne ćelije kontinuirano proizvode male, fiziološke količine NO, koji ima protektivnu antiinflamacijsku ulogu u vaskulaturi, dok se smanjeno stvaranje NO javlja u različitim patološkim stanjima i direktno je u vezi sa endotelnom disfunkcijom i vaskularnom inflamacijom (Steyers i Miller, 2014). Stvaranje NO u endotelnim ćelijama pod uticajem čitavog niza različitih faktora je regulisano ekspresijom eNOS, kako na nivou transkripcije, tako i na nivou posttranslacionih modifikacija (Wu i sar., 2011). Bilo je govora o tome da u vaskulaturi estrogene povećavaju ekspresiju proteina eNOS (pregledni rad Chambliss i Shaul, 2002), dok inflamacijski citokini poput TNF- α smanjuju ekspresiju eNOS vršeci supresiju aktivnosti promotora gena za eNOS i skraćujući polu-život iRNK za eNOS (Kleinbongard i sar., 2010).

eNOS na direktan način aktiviraju brojni fiziološki i metabolički stimuli, kao što su hemodinamske promene, ili agonisti koji se vezuju za odgovarajuće receptore, poput VEGF, PAF, acetilholina, bradikininina, histamina, E2 i drugih (pregledni radovi Zhao i sar., 2015; Garcia i Sessa, 2019). Agonisti poput acetilholina, bradikininina i histamina vezuju se za GPCR na membrani endotelnih ćelija povećavajući sledstveno koncentraciju Ca²⁺ u ćelijama. Kalcijum se vezuje za CaM, koji deluje kao alosterični modulator eNOS dovodeći do povećanog fluksa elektrona iz reduktaznog u oksigenazni domen enzima (slika 1.11).



Slika 1.11. Šematski prikaz signalnog puta endotelna azot-monoksid sintaza – azot-monoksid. Akt – protein kinaza B; CaM – kalmodulin; eNOS – endotelna azot-monoksid sintaza; NO – azot-monoksid; PKA – protein kinaza A; R – receptori. Preuzeto uz modifikacije iz Zhao i saradnici (2015).

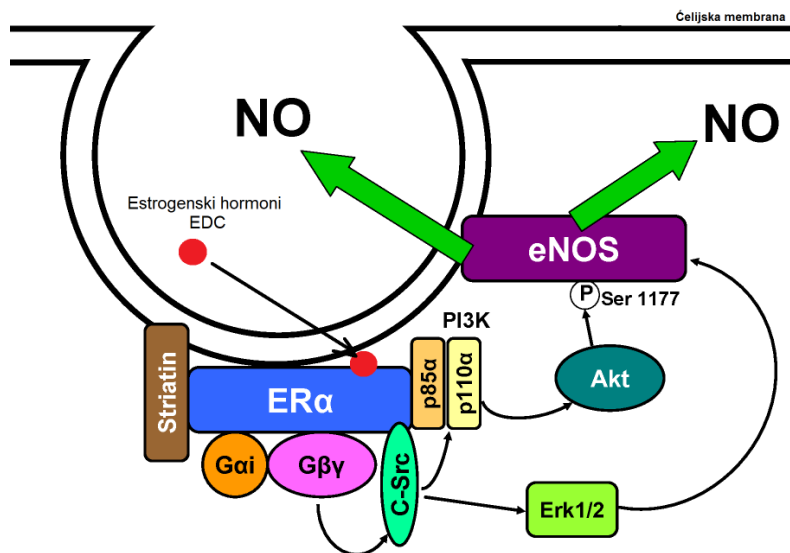
Sa druge strane, fosforilacija eNOS u endotelnim ćelijama je takođe značajna za aktivaciju enzima. Fosforilacija predstavlja posttranslacionu modifikaciju koja menja aktivnost enzima eNOS, aktivirajući ga ili inhibirajući. Tako se zna da fosforilacija na aminokiselinskim ostacima Tyr81, Ser615, Ser633 i Ser1177 humanog enzima eNOS stimuliše stvaranje NO, dok fosforilacije Ser114, Thr495 i Tyr657 deluju inhibitorno (slika 1.12) (Garcia i Sessa, 2019). Signalni putevi u kojima učestvuju protein kinaza A (eng. *protein kinase A*, PKA) i PKB/Akt se aktiviraju pod delovanjem različitih stimulusa, a oni zatim aktiviraju eNOS preko najvažnije aktivacione fosforilacije Ser ostatka na 1177. mestu. Sa druge strane, bradikinin i vodonik peroksid aktiviraju eNOS preko istovremene fosforilacije Ser1177 i defosforilacije Thr495 ostatka (pregledni rad Zhao i sar., 2015).



Slika 1.12. Šematski prikaz strukture humane endotelne azot-monoksid sintaze sa najznačajnijim mestima fosforilacije u molekulu. eNOS – endotelna azot-monoksid sintaza. Preuzeto iz Garcia i Sessa (2019).

Detaljnije, fosforilacija Ser1177 u domenu reduktazne aktivnosti enzima eNOS vodi ka većem protoku elektrona i većoj osetljivosti na Ca^{2+} , a samim tim i pojačava aktivnost enzima. Ova fosforilacija se vrši preko PI3K/Akt i ERK1/2, preko protein kinaze koja se aktivira pomoću AMP (AMPK), PKA i protein kinaze II zavisne od Ca^{2+} i CaM (CaMKII) (Wu i sar., 2011; Dymkowska i sar., 2019; Cyr i sar., 2020). Ovi signalni molekuli se aktiviraju različitim signalnim putevima: E2 i VEGF aktiviraju PI3K/Akt i ERK1/2, bradikinin aktivira CaMKII, insulin koji vrši funkciju posredstvom PI3K/Akt i AMPK, mehanički stres izazvan laminarnim tokom krvi koji zatim aktivira PKA i Akt i dr. (Wu i sar., 2011; Valdés i sar., 2008; Cyr i sar., 2020). Pored toga, u uslovima inflamacije TNF- α aktivira AMPK, čime se aktivira eNOS i stimuliše stvaranje NO, što predstavlja zaštitni mehanizam u cilju oporavka tkiva (Dymkowska i sar., 2019). Sa druge strane, fosforilacija Thr495, koju u uslovima mirovanja endotelnih ćelija vrši protein kinaza C, ima suprotan efekat. Ovim mehanizmom se usporava transfer elektrona i takođe favorizuje razdvajanje monomernih jedinica eNOS. Pokazano je da povećanje unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} stimuliše defosforilaciju Thr495, što je još jedan pokazatelj fine regulacije aktivnosti eNOS (Dymkowska i sar., 2019; Cyr i sar., 2020). Osim toga, acetilacija ostataka lizina na pozicijama Lys497 i Lys507, koji se takođe nalaze u domenu vezivanja CaM, sprečava njegovo vezivanje za eNOS. Pokazano je da sirtuin 1 (Sirt1) katalizuje deacetilaciju ovih lizinskih ostataka, što je još jedan od mnogobrojnih sistema regulacije aktivnosti eNOS (Dymkowska i sar., 2019).

U literaturi postoje brojni podaci o ulozi ER u endotelnim ćelijama. ER koji su eksprimirani u humanim endotelnim ćelijama su klasični ER α i ER β , kao i GPER (Isensee i sar., 2009; Kim i sar., 2014a). Poznato je da u endotelnim ćelijama vezivanje estrogenskih hormona za ove receptore aktivira nizvodne signalne puteve PI3K/Akt i MAPK/ERK, koji aktiviraju eNOS (Wu i sar., 2011) (slika 1.13). Pored estrogenskih hormona, pokazano je da pojedine hemikalije iz radnog i životnog okruženja koje deluju kao endokrini ometači (eng. *endocrine disrupting chemicals*, EDC) mogu da aktiviraju hormonske receptore poput ER i GPER (Matthews i sar., 2001; Andersson i Brittebo, 2012; Acconcia i sar., 2015; Mariana i sar., 2016).



Slika 1.13. Estrogenski hormoni i brojni endokrini ometači stimulišu stvaranje azot-monoksida u kaveoli endotelne ćelije preko aktivacije signalnih puteva fosfatidilinozitol 3-kinaze – protein kinaze B/Akt i kinaze regulisane vanćelijskim signalima 1 i 2. Akt – protein kinaza B; C-Src – kinaza c-Src; EDC – endokrini ometači; eNOS – endotelna azot-monoksid sintaza; ER α – estrogenski receptor α ; Erk1/2 – kinaza regulisana vanćelijskim signalima 1 i 2; G α i – α i subjedinica proteina G; G β γ – β γ subjedinica proteina G; NO – azot-monoksid; p110 α – katalitička subjedinica fosfatidilinozitol 3-kinaze; p85 α – regulatorna subjedinica fosfatidilinozitol 3-kinaze; PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza. Preuzeto uz modifikacije iz Wu i saradnici (2011).

1.4. Uticaj hemikalija iz radnog i životnog okruženja na razvoj kardiovaskularnih bolesti

Bolesti srca i krvnih sudova predstavljaju veoma heterogenu grupu bolesti, u koju se ubrajaju bolest koronarnih arterija, cerebrovaskularna bolest, bolest perifernih arterija, reumatska bolest srca, kongenitalna bolest srca, duboka venska tromboza, plućna embolija i dr. Osim navedenih bolesti, srčani i moždani udar predstavljaju akutne događaje koji su uzrokovani blokadom sudova koronarnog i cerebralnog krvotoka (Behera i sar., 2015; Frančula-Zaninović i Nola, 2018; World Health Organization (WHO), 2021). KVB se postepeno razvijaju tokom života i često se dešava da dug vremenski period ne ispoljavaju simptome zbog čega predstavljaju veliku opasnost po zdravlje ljudi (Frančula-Zaninović i Nola, 2018). S tim u vezi, KVB predstavljaju vodeći uzrok smrti na globalnom nivou. Procenjuje se da je 2019. godine 17,9 miliona ljudi umrlo od KVB, što predstavlja 32% svih smrtnih slučajeva u svetu te godine. Od 17 miliona prevremenih smrtnih slučajeva (mlađi od 70 godina života) 2019. godine, 38% je uzrokovano KVB (WHO, 2021). Procenjeno je da će do 2030. godine 23,6 miliona ljudi godišnje umirati od KVB (Frančula-Zaninović i Nola, 2018).

Faktori rizika za nastanak i razvoj KVB su mnogobrojni. Neki od ovih faktora su nepromenljivi poput pola, genetičke predispozicije i godina starosti pojedinca, dok su drugi faktori varijabilni i na njih se može uticati (Frančula-Zaninović i Nola, 2018). Geografski položaj i migracija, nadmorska visina, geografska širina i dužina, cirkadijalni ritam, izloženost suncu, godišnja doba, okruženost prirodnim površinama i drugi geografski faktori predstavljaju varijabilne faktore koji utiču na kardiovaskularni sistem (Bhatnagar, 2017). Neki od poznatih faktora rizika na koje se može uticati su i pušenje cigareta, nedostatak fizičke aktivnosti, neadekvatna ishrana, gojaznost, izloženost hemikalijama iz životne sredine i dr., koji dalje doprinose razvoju povišenog krvnog pritiska, insulinske rezistencije, dijabetesa tipa 2, dislipidemije i dr. (Cosselman i sar., 2015; Bhatnagar, 2017; Frančula-Zaninović i Nola, 2018; Riggs i sar., 2018).

Kako ateroskleroza predstavlja lokalnu inflamaciju krvnog suda koja se nalazi u osnovi mnogih KVB, velika naučna pažnja je posvećena upravo otkrivanju uzročnika ateroskleroze. Razvoj ateroskleroze zavisi kako od genetičke predispozicije, tako i od ishrane, fizičke aktivnosti, pušenja i od celokupnog zdravlja organizma i pojave hipertenzije, dijabetesa, gojaznosti i sl. (Hennig i sar., 2007; Migliaccio i sar., 2022). Smatra se da hiperlipidemija predstavlja najveći faktor rizika za razvoj ateroskleroze. Međutim, svega polovina pacijenata sa aterosklerotskim promenama u krvnim sudovima ima povišen nivo lipida u krvi (Hennig i sar., 2007). Trend povećanja ateroskleroze među pacijentima i posledično KVB ukazuje na to da postoje i drugi faktori koji utiču na razvoj ovog inflamacijskog stanja (Migliaccio i sar., 2022). S tim u vezi, sve veća naučna pažnja je usmerena upravo ka identifikaciji novih faktora rizika poput hroničnog izlaganja buci, psihološkim stresorima i izloženosti hemikalijama iz radnog i životnog okruženja (Lechner i sar., 2020).

Tradicionalni programi prevencije KVB se baziraju na kontroli i promeni varijabilnih faktora na koje pojedinac ima uticaj kao što su životni stil, ishrana, geografski položaj i slično. Međutim, veliku ulogu u razvoju i stepenu napredovanja KVB takođe imaju faktori na koje pojedinac ima veoma mali uticaj. U pitanju su zagađivači iz životne sredine poput različitih sintetičkih hemikalija (bisfenol A, ftalati, sintetički pesticidi i rastvarači i dr.), dim cigareta, izduvni gasovi nastali sagorevanjem fosilnih goriva, zatim organske hemikalije (CO, NO₂, SO₂, O₃ i dr.), teški metali (gvožđe, arsen, kadmijum i dr.), kao i buka i ekstremni temperaturni uslovi na koje su srce i vaskularni sistem izuzetno osetljivi (Cosselman i sar., 2015; Bhatnagar, 2017; Burroughs Peña i Rollins, 2017).

Veliku opasnost po kardiovaskularno zdravlje predstavljaju sintetičke hemikalije poput pesticida, bisfenola A i ftalata od kojih su mnogi klasifikovani kao EDC (Hennig i sar., 2007; Su i

sar., 2019a; Su i sar., 2019b; Adeyemi i sar., 2021; Migliaccio i sar., 2022). Prema nekim procenama, u svetu se trenutno proizvodi više od 30.000 različitih hemikalija od kojih se najmanje 5.500 godišnje proizvodi u količinama koje prevazilaze 100 tona. Smatra se da ne postoji mesto na planeti koje nije zagađeno nekim sintetičkim polutantom (Bhatnagar, 2017).

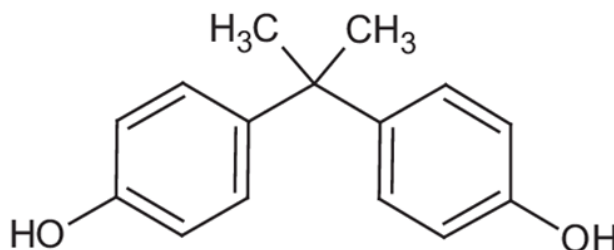
Većina zagađivača iz radnog i životnog okruženja utiče na dobro poznate „zajedničke puteve razvoja KVB“ poput ishemije, aritmije, promena u srčanoj strukturi i funkciji i stvaranja aterosklerotskog plaka (Cosselman i sar., 2015). Zagađivači iz vazduha se usvajaju udisanjem, hranom i apsorpcijom putem kože. Izloženost zavisi od stila života poput vremena provedenog van kuće, pijenja vode, nivoa fizičke aktivnosti i radnog okruženja (Cosselman i sar., 2015; Burroughs Peña i Rollins, 2017). Osim toga, fiziološki odgovor na usvojenu dozu zagađivača se takođe razlikuje od individue do individue i zavisi od mnogih faktora poput celokupnog zdravlja, efekata ko-polutanata, varijacija u genima koji kodiraju enzime za detoksikaciju i dr. (Cosselman i sar., 2015). Stoga, put razvoja KVB, kao i faktori koji utiču na razvoj ovih bolesti, predstavljaju veoma kompleksnu mrežu kojoj se posvećuje sve veća naučna pažnja upravo zbog globalne tendencije porasta KVB.

Usled velikog obima proizvodnje i široke upotrebe proizvoda od plastike u svakodnevnom životu, poslednjih godina se zapaža porast interesovanja stručne i naučne zajednice u pravcu ispitivanja štetnih uticaja plastike na ljudsko zdravlje. Plastika predstavlja materijal koji je lagan, dugotrajan, široko primenjiv i isplativ. Plastika se našla u proizvodnji pakovanja za hranu i piće, sintetičkih vlakana, odeće, medicinskih uređaja, građevinskog materijala, adhezivnih sredstava i mnogih drugih proizvoda, što je čini nezamenjivim materijalom u savremenom svetu (Hahladakis i sar., 2023). Tokom proizvodnje, u plastičnu smešu se dodaju razne hemikalije poput aditiva i katalizatora u cilju unapređivanja kvaliteta plastike i započinjanja procesa polimerizacije (Hahladakis i sar., 2023). Bisfenoli i ftalati predstavljaju hemikalije koje se koriste u proizvodnji mnogih proizvoda od plastike, proizvoda za ličnu upotrebu i medicinske opreme. S tim u vezi, sve do danas sprovedene biomonitoring studije, bez izuzetka, su pokazale da je prisustvo ovih hemikalija u telesnim tečnostima detektovano kod najmanje 75–90% svetske populacije (Ramadan i sar., 2020). Opasnost po ljudsko zdravlje se ogleda u tome što je potvrđeno da ove hemikalije predstavljaju EDC, što ih dovodi u vezu sa raznim poremećajima i oboljenjima, između ostalog i sa KVB (Wang i sar., 2019a; Mariana i Cairrao, 2020; Hahladakis i sar., 2023).

1.5. Bisfenol A

1.5.1. Osnovne karakteristike i upotreba bisfenola A

Bisfenol A (eng. *bisphenol A*, BPA, 2,2-bis(4-hidroksifenil)propan, CAS# 80-05-7, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol-A>) je industrijska hemikalija široke proizvodnje koja ulazi u sastav plastike. BPA je 1891. godine prvi put opisao ruski hemičar Aleksandr Dianin, a sintetisao ga je Zincke 1905. godine tako što je kondenzovao aceton sa dva ekvivalenta fenola (Jalal i sar., 2018). BPA je bezbojna čvrsta supstanca molarne mase 228,29 g/mol. Molekulska formula BPA je $C_{15}H_{16}O_2$. Strukturna formula je prikazana na slici 1.14.



Slika 1.14. Strukturna formula bisfenola A.

Na globalnom nivou je samo tokom 2013. godine proizvedeno oko 7 miliona tona BPA, 2015. godine je taj broj porastao na 7,7 miliona tona i procenjeno je da taj broj raste svake godine (Lehmler i sar., 2018; Shamhari i sar., 2021). BPA se koristi u proizvodnji polikarbonatne plastike i epoksi smola od kojih se prave razni proizvodi poput pakovanja za hranu i piće, stomatoloških zaptivnih sredstava, termalnog papira za štampanje, CD i DVD diskova, cevi za vodu, medicinskih uređaja, dečijih igračaka, elektronike i delova za automobile (Nachman i sar., 2014; Ma i sar., 2019; Ramadan i sar., 2020). Plastifikatori poput BPA i ftalata nisu kovalentno vezani za plastiku, te pri promeni temperature i pH lako dolazi do njihovog otpuštanja iz proizvoda u kojima se nalaze i migracije u vazduh, piće i hranu, a potom i u pljuvačku, pluća, kožu i krv čoveka (Acconcia i sar., 2015; Mathieu-Denoncourt i sar., 2015).

1.5.2. Prisustvo bisfenola A u tkivima i telesnim tečnostima ljudi

Zbog široke proizvodnje i kontinuirane upotrebe BPA, sprovedene su brojne biomonitoring studije koje su ukazale na visoku i sveprisutnu izloženost ljudi ovom plastifikatoru. Naime, BPA je detektovan u urinu više od 90% ispitanika iz različitih zemalja (Koch i sar., 2012; LaKind i sar., 2012a; Lehmler i sar., 2018). Koncentracije ukupnog, konjugovanog i nekonjugovanog, BPA u urinu su kod većine odraslih ispitanika iznosile do 3 ng/mL, a zabeležene su i vrednosti od 395 ng/mL kod odraslih i 946 ng/mL kod prevremeno rođene dece. Veliki problem predstavlja to što mnoge studije nisu detektovale nekonjugovani BPA u urinu, zato što ovaj oblik predstavlja „roditeljsku hemikaliju” (eng. *parent compound*) koja ispoljava endokrinu aktivnost. Međutim, druge studije su pokazale da vrednosti nekonjugovanog BPA u urinu iznose do 2,5 ng/mL kod odraslih, odnosno 17,3 ng/mL kod prevremeno rođene dece (Vandenberg i sar., 2010). Pregledni rad od Colorado-Yohar i saradnika (2021) je prikazao medijane izmerenih vrednosti BPA u urinu koje su iznosile od 1,64–2,41 ng/mL.

BPA je detektovan u krvi 92,6% ispitanika sa pragom detekcije 0,4 ng/mL (pregledni rad Jalal i sar., 2018). U preglednom radu Vandenberg i saradnika (2010) je prikazano da se BPA u serumu odraslih pacijenata, isključujući trudnice, rutinski detektuje kao izvorno jedinjenje okvirnih vrednosti od 1 ng/mL, ali da te vrednosti dosežu i do 2,5 ng/mL, dok kod trudnica medijalna vrednost iznosi do ~9 ng/mL, a najviša izmerena vrednost čak 66,48 ng/mL. Kaddar i kolege (2009) su takođe potvrdili te podatke i objavili da je u njihovom istraživanju 70% pacijenata na dijalizi imalo merljive količine nekonjugovanog BPA u plazmi, a vrednosti su bile veće od 10 ng/mL. Ovi podaci ukazuju na to da je opšta populacija, a pogotovo osetljive grupe, konstantno izložena BPA.

Osim u urinu i krvi, BPA je detektovan u kosi, znoju, folikulskoj i amnionskoj tečnosti, u krvi iz pupčane vrpce pri porođaju, placenti, u krvi i jetri ljudskih fetusa, u humanom mleku i dr. (pregledni radovi Vandenberg i sar., 2010; Jalal i sar., 2018). Prisustvo BPA u urinu muškaraca i žena iz istog domaćinstva su bili u korelaciji, što ukazuje na zajednički izvor izlaganja ovom plastifikatoru. Ipak, kod žena je zabeležena veća koncentracija BPA nego kod muškaraca, kod dece veća koncentracija nego kod adolescenata, a kod adolescenata veća nego kod odraslih ispitanika, što ukazuje na polnu i starosnu zavisnost.

Ispitujući uzorke sakupljene u studiji „United States National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES)“ u periodu od 2003–2014. godine, Cai i saradnici (2020) su utvrdili da je koncentracija BPA u urinu pacijenata sa KVB varirala u rasponu 52–978 µg/g kreatinina. Shankar i saradnici (2012) su objavili da je srednji nivo BPA u urinu 745 odraslih pacijenata obolelih od bolesti perifernih arterija u Sjedinjenim Američkim Državama u okviru NHANES studije u periodu 2003–2004. godine iznosio 2,3 ng/mL, dok su Melzer i saradnici (2011) ispitali nivo BPA u urinu 96 muškaraca koji su učestvovali u populacionoj studiji „InCHIANTI“ i uočili da je srednja vrednost koncentracije BPA u urinu iznosila 3,65 ng/mL. Ova istraživačka grupa je takođe ispitala nivo BPA u urinu u okviru NHANES studije i izmerila je vrednosti od

2,49 ng/mL tokom 2003. i 2004. godine i 1,79 ng/mL tokom 2005. i 2006. godine (Melzer i sar., 2010), a pored toga je u okviru studije „The Metabolomics and Genomics in Coronary Artery Disease (MaGiCAD)“ izmerila koncentraciju BPA u urinu sa medijalnom vrednosti od 1,53 ng/mL (Melzer i sar., 2012a).

1.5.3. Metabolizam bisfenola A

Konjugacija je važan proces detoksikacije ili inaktivacije ksenobiotika zato što se tim procesom lipofilna jedinjenja konvertuju u njihov hidrofilni oblik, koji se lakše eliminiše iz organizma. Glavnu ulogu u neutralisanju ksenobiotika imaju enzimi koji učestvuju u procesima metabolisanja lekova i hemijski transporteri. Tako i BPA, nakon što se unese hranom, u jetri podleže glukuronizaciji. Prevođenje izvornog oblika BPA do BPA-glukuronida vrši enzim UGT2B1, izoforma UDP-glukuronoziltransferaze (Inoue i sar., 2016). Glukuronizacija BPA u jetri je nešto sporija tokom trudnoće i fetalnog razvoja (Jalal i sar., 2018), što može da objasni povišene koncentracije BPA u telesnim tečnostima trudnica. Slobodan BPA takođe podleže i procesu sulfokonjugacije, ali u znatno manjoj meri, pri čemu nastaje BPA-sulfat (pregledni rad Cho i sar., 2017). Ovu reakciju vrše enzimi iz grupe fenolsulfotransferaza SULT1, od kojih za BPA najveći afinitet ima izoforma SULT1A1 (Inoue i sar., 2016). Na taj način se lipofilni BPA konvertuje u hidrofilni oblik i u tom obliku se lakše ekskretuje iz organizma. Pored toga, slobodni BPA je fiziološki aktivan, dok njegovi konjugovani oblici nisu (pregledni rad Cho i sar., 2017).

Treba istaći da slobodni (nekonjugovani) BPA u aktivnom obliku može da cirkuliše u krvi 1–2 h nakon oralnog unosa u organizam, pre nego što organizam pokrene sistem eliminacije (Jalal i sar., 2018). Takođe je važno napomenuti da je toksikokinetika BPA drugačija kada je organizam kontinuirano izložen ovoj hemikaliji u odnosu na jednokratnu izloženost (Vandenberg i sar., 2010). Stahlhut i saradnici (2009) tvrde da je poluživot BPA u ljudskom organizmu mnogo duži od 6 h, koliko se ranije smatralo da iznosi. Thayer i saradnici (2015) su pokazali da su ispitanici u studiji ekskretovali 93% BPA (nekonjugovanog i konjugovanog) 24 h nakon unošenja u organizam i da se taj procenat neznatno povećao tri dana nakon izlaganja ovoj supstanci, na ~95%. Sa druge strane, Völkel i saradnici (2002) i Teeguarden i saradnici (2015) podržavaju pretpostavku da se skoro 100% oralno unešenog BPA ekskretuje urinom u konjugovanom obliku (pregledni rad Cho i sar., 2017). Neusaglašenost ovih tvrdnji sa prethodnim se ogleda upravo u dugoročnom izlaganju BPA, kao i njegovom taloženju u tkivima bogatim lipidima, čime se produžava interna izloženost BPA.

1.5.4. Reglativa i ograničenja vezana za upotrebu bisfenola A

Zbog sve veće izloženosti ljudi BPA i opasnosti koju predstavlja po ljudsko zdravlje, u nekoliko zemalja je zabranjena upotreba BPA u proizvodnji flašica za bebe, pakovanja hrane za bebe i decu mlađu od 3 godine (European Commission 2011; U.S. Food and Drug Administration 2014; Government of Canada 2020), što je dovelo do smanjenja nivoa detektovanog BPA u urinu dece i adolescenata (Wells i sar., 2013; Lehmler i sar., 2018). Evropska agencija za bezbednost hrane (eng. *European Food Safety Authority* EFSA) je 2015. godine izložila da granica za količinu BPA, koja može da se unese u ljudski organizam u toku jednog dana bez štetnih efekata po zdravlje, iznosi 4 µg po 1 kg telesne mase. Prema najnovijim preporukama, ta granica je 2023. godine spuštena na 0,2 ng po 1 kg telesne mase (<https://www.efsa.europa.eu/en/news/bisphenol-food-health-risk>). S tim u vezi, Evropska agencija za hemikalije (eng. *European Chemicals Agency*, ECHA) je odobrila da se BPA koristi u proizvodnji pakovanja za hranu sa ograničenjem da samo 0,05 mg BPA/kg sme da se ispušta u hranu iz tog pakovanja. Komisija je takođe postavila granicu za količinu BPA koja sme da se ispušta iz igraćaka za decu do 3 godine starosti, a koje su namenjene za oralnu upotrebu deteta, i ona iznosi 0,04 mg/L (<https://echa.europa.eu/hot-topics/bisphenols>). Međutim, veliki udeo kako odrasle populacije tako i dece je i dalje kontinuirano

izložen BPA zbog nekontrolisane i neregulirane upotrebe ovog plastifikatora u mnogim drugim proizvodima.

1.5.5. Bisfenol A kao endokrini ometač

BPA je do 1940. godine prepisivan ženama kao sintetički estradiol, da bi kasnije, u periodu od 1940. do 1971. godine, bio zamenjen drugim sintetičkim estradiolom koji se zove dietilstilbesterol (DES) u lečenju komplikacija u trudnoći. Kasnije je DES takođe povučen kao lek zato što je pokazano da indukuje rak grlića materice (Jalal i sar., 2018). Danas se zna da hemikalije iz radnog i životnog okruženja koje oponašaju endokrine hormone mogu da poremete normalno funkcionisanje endokrinog sistema, te se zbog toga nazivaju EDC.

BPA je klasifikovan kao EDC, supstanca koja ometa homeostazu endokrinog sistema na taj način što ili menja metabolizam i sintezu endogenih hormona ili ispoljava dejstvo slično endogenim hormonima (Mariana i sar., 2016). Iako BPA ima 1.000–10.000 puta slabiji afinitet za ER od E2 (Jalal i sar., 2018), vezivanje E2 može biti sprečeno time što se BPA kompetitivno vezuje za ER (pregledni rad Cho i sar., 2017).

Sve više je rezultata koji ukazuju na to da BPA inhibira sekreciju E2 iz granulosa ćelija u folikulu jajnika. Pokazano je i da BPA smanjuje nivo E2 i drugih hormona u mišjem i svinjskom jajniku, i to na dozno i vremenski zavisani način. Isti trend je zapažen na ćelijskoj liniji humanih granulosa ćelija jajnika KGN i kod luteiniziranih granulosa ćelija jajnika, sakupljenih od žena tokom procesa vantelesne oplodnje (pregledni rad Cho i sar., 2017). Pored toga, BPA se vezuje za membranski ER, a pretpostavlja se da je i antagonist androgenskog receptora, čime remeti niz signalnih puteva (Jalal i sar., 2018). Navedena endokrina svojstva BPA mogu da izazovu razne poremećaje kod žena kao što su prevremeni pubertet, veća šansa za nastanak endometrioze, neregularni ciklusi, sindrom policističnih jajnika, viša stopa bezuspešne implantacije embriona i višestruki spontani pobačaji (Caserta i sar., 2014; Jalal i sar., 2018; Ohore i Zhang, 2019; Pivonello i sar., 2020).

Studije su pokazale da BPA u nižim koncentracijama (50 µg/kg) povećava aktivnost osovine hipotalamus-hipofiza-gonade kod muškaraca (Shamhari i sar., 2021). Određeni radovi su prikazali rezultate povećanja nivoa testosterona kod muškaraca pod uticajem BPA, dok drugi tvrde da BPA ima suprotan efekat (Shamhari i sar., 2021). Istraživanje na pacovima je pokazalo da BPA u nižim koncentracijama smanjuje lučenje testosterona (Shamhari i sar., 2021). Pored toga, na eksperimentalnim životinjama je u više radnih grupa utvrđeno da BPA ometa spermatogenezu i izaziva histopatološke promene u testisima, što neizbežno izaziva poremećaje u razvoju spermatozoida (Shamhari i sar., 2021).

Pored toga što utiče na reproduktivni sistem, BPA može da utiče na razviće, da podstakne razvoj kardiovaskularnih oboljenja, gojaznosti, dijabetesa i metaboličkih bolesti (Nachman i sar., 2014). Uprkos obilju podataka o njegovom endokrinom potencijalu, i dalje nisu otkriveni svi aspekti uticaja BPA na ljudski organizam i celokupno zdravlje (Prins i sar., 2019; vom Saal, 2019).

1.5.6. Efekti bisfenola A na nivou kardiovaskularnog sistema

Uzročno-posledični odnos izlaganja BPA i nastanka i razvoja KVB je prvi put uočen poslednjih godina. Iako su rezultati pojedinih studija ukazivali na to da BPA ne utiče na razvoj KVB (LaKind i sar., 2012b; Olsén i sar., 2012), mnoge epidemiološke studije su stavile akcenat upravo na pozitivnu korelaciju između prisustva BPA u urinu ljudi sa faktorima rizika za razvoj KVB (Fu i sar., 2020) i pojavom KVB poput aritmije, angine pektoris, moždanog i srčanog udara i kongestivne srčane insuficijencije (Gao i Wang, 2014; Posnack, 2014; Han i Hong, 2016; Cai i sar.,

2020). Tsen i saradnici (2021) su opisali potencijalnu vezu između izlaganja BPA i pojave KVB kod mladih ljudi.

S tim u vezi, epidemiološke studije su pokazale pozitivnu korelaciju između izlaganja ljudi visokim koncentracijama BPA u radnom i životnom okruženju i pojave bolesti perifernih (Shankar i sar., 2012) i srčanih arterija (Melzer i sar., 2012a; Melzer i sar., 2012b). Pomenute studije su ukazale na potencijalni uzročno-posledični odnos između izlaganja BPA i pojave ateroskleroze. U prilog tome idu i rezultati eksperimentalnih studija na životinjskim modelima koji sugerišu da izlaganje BPA dovodi do razvoja ateroskleroze kod pacova (Kim i sar., 2014b; Sui i sar., 2014, 2018) i zečeva (Fang i sar., 2014, 2015), ali da BPA može da izazove i druge KVB kod životinja (pregledni radovi Gao i Wang, 2014; Posnack, 2014). Uprkos tome, veoma je teško opisati tačan kauzalni odnos između izlaganja BPA i nastanka i razvoja KVB kod ljudi, zbog toga što se rezultati istraživanja dobijeni na životinjskim modelima ne mogu direktno ekstrapolirati na ljudsku fiziologiju. To se posebno odnosi na studije koje primenjuju doze BPA koje ne odgovaraju koncentracijama kojima je čovek realno izložen u svom radnom i životnom okruženju.

Osim epidemioloških studija i studija na animalnim modelima, kratka je lista studija koje su u uslovima *in vitro* ispitivale uticaj izlaganja BPA na humane makrovaskularne endotelne ćelije u koncentracijama koje su u skladu sa prisustvom ove supstance u životnoj sredini. Ribeiro-Varandas i saradnici (2014) su humane endotelne ćelije vene pupčane vrpce (eng. *human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) izlagali niskim koncentracijama BPA (44×10^{-9} i $4,4 \times 10^{-6}$ M BPA) koje odgovaraju realnoj izloženosti prosečnog čoveka. Autori su zaključili da BPA utiče na starenje HUVEC ćelija, a takođe su spekulisali da ima potencijal da izazove aterosklerozu. Andersson i Brittebo (2012) su ispitivali uticaj nižih koncentracija BPA koje odgovaraju nivoima detektovanim u uzorcima ljudske krvi (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} i 10^{-6} M BPA) na humane endotelne ćelije u uslovima *in vitro* i zaključili da BPA stimuliše ekspresiju angiogenih faktora i formiranje endotelnih tuba. Ji i sar (2022) su utvrdili da je 87,7 nM najviša koncentracija BPA koja nije toksična za HUVEC ćelije, a potom su HUVEC ćelije izložili BPA u toj koncentraciji. Za razliku od prethodno navedenih studija, Ji i saradnici su pokazali da BPA inhibiše formiranje endotelnih tuba u uslovima *in vitro*. Nedoslednost ovih rezultata donekle može da se objasni karakteristikom endokrinih ometača da izazovu krivu odgovora koja nije nužno u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom same supstance (eng. *non-monotonic dose response curves*, NMDRC) (Vandenberg, 2014).

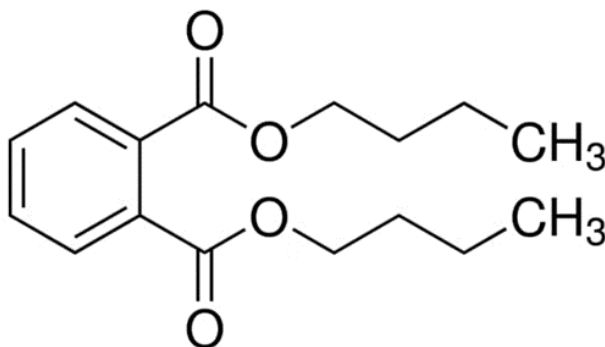
Uočeno je da BPA vezivanjem za ER remeti normalno funkcionisanje kardiovaskularnog sistema. Međutim, tačan mehanizam delovanja BPA na nivou kardiovaskularnog sistema je još uvek nepoznat (Fonseca i sar., 2022). Pored toga, istraživanja sprovedena u uslovima *in vitro* koja imitiraju realnu izloženost čoveka sredini u kojoj živi, u smislu višemesečnog izlaganja niskim koncentracijama BPA do danas nisu sprovedena, a nisu poznati ni tačni signalni mehanizmi preko kojih BPA ispoljava efekte na nivou humanog endotela. Očigledna je potreba za ispitivanjem uticaja BPA na endotelnu disfunkciju u kontekstu KVB. Od suštinske važnosti je da se ustanovi tačan mehanizam delovanja BPA na endotelne ćelije, kao i da se ispita funkcijski odgovor endotelnih ćelija na dugoročno izlaganje ovoj hemikaliji koje odgovara realnoj izloženosti u sredini u kojoj živimo.

1.6. Dibutil-ftalat

1.6.1. Osnovne karakteristike i upotreba dibutil-ftalata

Druga grupa hemikalija koje se koriste u proizvodnji plastike su ftalati. Ftalati predstavljaju plastifikatore koji su po strukturi diestri ftalne kiseline (Mariana i sar., 2016). Dele se u dve grupe, na ftalate niske i visoke molekulske mase. Ftalati visoke molekulske mase se koriste u proizvodnji PVC polimera, plastike, ambalaže za hranu, igračkaka, podnih obloga i mnogih drugih proizvoda,

dok se ftalati niske molekulske mase koriste u proizvodnji boja i lakova, adhezivnih sredstava, proizvoda za ličnu higijenu i dr. (Wang i sar., 2019a). Jedan od ftalata koji je našao široku primenu u industriji je dibutil-ftalat (eng. *dibutyl phthalate*, DBP, CAS# 84-74-2, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3026>), inertna, bezbojna, viskozna tečnost, molarne mase 278,34 g/mol. Molekulska formula DBP je C₁₆H₂₂O₄. Strukturna formula je prikazana na slici 1.15.



Slika 1.15. Strukturna formula dibutil-ftalata.

Pored dietilheksil-ftalata (eng. *di(2-ethylhexyl) phthalate*, DEHP), DBP je najrasprostranjeniji i najviše korišćen ftalat (Singh i Li, 2011). DBP je ftalat niske molekulske mase koji se dobija reakcijom n-butanola sa anhidridom ftalne kiseline (Craig i Ziv-Gal, 2018). DBP ulazi u sastav celulozne plastike, ali se takođe koristi i u proizvodnji insekticida, adheziva za lateks, rastvarača za farbe, mastila i boja, sredstava za održavanje automobila, odeće, obloženih lekova, plastičnih filmova u ambalažama za hranu, kozmetičkih i drugih proizvoda za ličnu higijenu (Mariana i sar., 2016; Karačonji i sar., 2017; Craig i Ziv-Gal, 2018; Wang i sar., 2019a). Od proizvoda koji se koriste svakodnevno, nalazi se u kozmetici, kremama, šamponima, parfemima, svećama, lakovima za nokte i dr. (Karačonji i sar., 2017; Craig i Ziv-Gal, 2018). S obzirom na široku upotrebu DBP u brojnim industrijskim proizvodima i proizvodima za ličnu upotrebu, ova hemikalija se u Evropskoj Uniji proizvodi i/ili uvozi u količini od 1.000 do 10.000 tona godišnje ([Dibutyl phthalate-Substance Information-ECHA](#)), dok se procenjuje da proizvodnja DBP na globalnom nivou iznosi i do 50.000 tona godišnje (Bredhult i sar., 2007). Kao i BPA, ni DBP nije kovalentno vezan za proizvod u kom se nalazi (Mariana i sar., 2016), zbog čega lako može na direktan ili indirektan način da dospe u organizam čoveka.

1.6.2. Prisustvo dibutil-ftalata u tkivima i telesnim tečnostima ljudi

DBP i njegov metabolit monobutil-ftalat (eng. *mono-n-butyl phthalate*, MBP) su detektovani u ljudskim telesnim tečnostima, kosi i noktima (Wang i sar., 2019a; Huang i sar., 2021), što ukazuje na činjenicu da su ljudi generalno izloženi ovom EDC.

Smatra se da DBP ispoljava svoje efekte u organizmu upravo preko MBP (<https://www.epa.gov/>). Prema podacima iz brojnih biomonitoring studija, MBP je široko rasprostranjen u ljudskim tkivima i predstavlja marker izloženosti ljudske populacije DBP. Osim u urinu, MBP je detektovan i u krvi, amniotskoj tečnosti, mleku i pljuvački (<https://www.epa.gov/>), što ukazuje na to da je ljudska populacija u značajnoj meri i kontinuirano izložena DBP. Tako je, na primer, 11 µg MBP/L pronađeno u urinu kod populacije koja nije profesionalno izložena DBP (Gomez Ramos i sar., 2016). U urinu adolescenata pronađene su koncentracije MBP od 38 µg/L (Geens i sar., 2014), dok je kod dece starosti 3–14 godina detektovan MBP u urinu u koncentraciji od 96 µg/L (Becker i sar., 2009). MBP je detektovan u 99% uzoraka urina sakupljenih u okviru

NHANES studije u periodu od 1999–2000. godine (Silva i sar., 2004), kao i u >90% uzoraka urina sakupljenih od učesnika studije Canadian Health Measures Survey 2007–2009 (Saravanabhavan i sar., 2013). Caporossi i saradnici (2021) su detektovali koncentracije MBP u rasponu od 71,42 do 220,9 µg/L u urinu žena, pri čemu su koncentracije zavisile od zanimanja kojim su se ispitanice bavile. Žene imaju viši nivo MBP u urinu nego muškarci, što može biti povezano sa redovnijom upotrebom kozmetičkih proizvoda (Rodríguez-Carmona i sar., 2019). MBP se nalazi u većoj koncentraciji u urinu dece nego u urinu odraslih (Mariana i sar., 2016). Pokazano je da deca imaju viši nivo metabolita ftalata u urinu od odraslih, što govori da su deca više izložena ftalatima i stoga podložnija delovanju ovih hemikalija, a što može dovesti do nepovoljnih zdravstvenih ishoda u kasnijem životu ili odraslom dobu (Lu i sar., 2018).

Zapaženo je da se i sam DBP akumulira u adipoznom tkivu i mleku majki koje su zbog profesije kojom se bave izložene većim količinama DBP (Geyer i sar., 1986). Reddy i saradnici (2006) su merili koncentraciju DBP u krvi žena iz Južne Indije koje nisu profesionalno izložene ovoj hemikaliji. Srednja vrednost izmerenih vrednosti DBP je iznosila 0,11 µg/mL u krvi zdravih žena kontrolne grupe, dok su koncentracije u krvi žena sa endometriozom dosežale do vrednosti od 1,05 µg/mL. Högberg i saradnici (2008) su izmerili 1,5–20 ng/mL (srednja vrednost: 2,8 ng/mL) DBP u majčinom mleku, 0,21–9,1 ng/mL (srednja vrednost: 1,2 ng/mL) u krvi, odnosno serumu, dok je koncentracija metabolita MBP u urinu iznosila 5,1–198 ng/mL (srednja vrednost: 53 ng/mL). U jednoj studiji je DBP detektovan u serumu 100% ispitanika iz Kine sa srednjim vrednostima od 162,4 ng/mL (Zhang i sar., 2018). Wang i saradnici (2019a) su u preglednom radu sumirali da su biomonitoring studije širom sveta izmerile koncentracije MBP u urinu u koncentraciji od 0 do 181 ng/mL (medijalne vrednosti).

1.6.3. Metabolizam dibutil-ftalata

Craig i Ziv-Gal (2018) navode da se čak 65–80% oralno unešenog DBP eliminiše urinom i to uglavnom u obliku MBP. Silva i saradnici (2003) tvrde da se oko 80% DBP unešenog oralnim putem apsorbuje u gastrointestinalnom traktu, odnosno da se DBP najvećim delom hidrolizuje do MBP i n-butanola pod delovanjem crevnih lipaza, te se potom skoro u potpunosti apsorbuje u sistemsku cirkulaciju. Razgradnja ftalata se u organizmu odvija u dve faze. Prva faza predstavlja razgradnju na monoestre koji potom podležu procesima hidrosilacije ili oksidacije, pri čemu nastaju hidrosilisani i u mnogo manjoj meri (~8%) oksidovani monoestri (Silva i sar., 2003; Karačonji i sar., 2017; Wang i sar., 2019a). Na taj način se DBP metaboliše u MBP. U drugoj fazi se monoestri i hidroksi- i oksi-monoestri konjuguju sa glukuronidima ili sulfatima (Karačonji i sar., 2017; Wang i sar., 2019a). I nekonjugovani i konjugovani oblici ftalata se eliminišu iz organizma putem urina i fecesa (Karačonji i sar., 2017). Poluživot ftalatih diestara u plazmi ili urinu iznosi manje od 24 h (Wang i sar., 2019a), dok Genuis i saradnici (2012) tvrde da iznosi manje od 5 h.

1.6.4. Regulatorna i ograničenja vezana za upotrebu dibutil-ftalata

DBP je od strane ECHA stavljen na listu supstanci kandidata od velikog značaja za autorizaciju ([Candidate List of substances of very high concern for Authorisation](#)). Evropska Komisija je u decembru 2018. godine donela Regulatornu (EU) 2018/2005 u kojoj je istaknuto da „DBP predstavlja neprihvatljiv rizik po ljudsko zdravlje kada se nalazi u plastičnim materijalima” i dodatno je ograničila upotrebu DBP tako da osim igraćaka i proizvoda za decu, što je već prethodno bilo regulisano, obuhvata i ostale proizvode uz direktivu da količina ftalata ne sme da prelazi 0,1% od ukupne težine proizvoda ([Commission Regulation \(EU\) 2018/2005](#)). Ovo ograničenje se ne odnosi samo na DBP, već na ukupan zbir četiri najčešće korišćena ftalata u proizvodnji plastičnih materijala.

Upotreba DBP u kozmetičkim proizvodima je već zabranjena u nekoliko zemalja poput Australije i zemalja Evropske Unije (Craig i Ziv-Gal, 2018).

1.6.5. Dibutil-ftalat kao endokrini ometač

Ftalati su, kao i BPA, prepoznati kao EDC zato što remete normalno funkcionisanje endokrinog sistema (Mariana i sar., 2016). Zbog toga je DBP najviše ispitivan u kontekstu uticaja koji ispoljava na nivou reproduktivnog sistema. Caporossi i saradnici (2021) su merili nivo MBP u urinu žena i ukazali na statistički značajno povećanje nivoa MBP kod pacijentkinja sa poremećajima u ovulaciji i endokrinim parametrima u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultati epidemioloških studija su ukazali na vezu između prisustva DBP u telesnim tečnostima žena i pojave endometrioze, kraćeg trajanja trudnoće i prevremenog porođaja (Mariana i sar., 2016), promena u ovarijumskoj rezervi, broja oocita prilikom veštačke oplodnje i dr. Eksperimentalna istraživanja su procenila da DBP, u koncentracijama koje su izmerene u ljudskim telesnim tečnostima, remeti folikulogenezu, kao i fiziologiju granulosa ćelija i luteinskih ćelija jajnika. Tačnije, DBP smanjuje nivo E2 i progesterona, povećava nivo hormona koji stimuliše folikule (FSH) i smanjuje broj antrumskih folikula kod ženki miševa (Craig i Ziv-Gal, 2018). Pored toga, studije sprovedene na modelu miševa i pacova su pokazale da je izlaganje DBP za posledicu imalo pojavu različitih reproduktivnih anomalija kod potomaka (Craig i Ziv-Gal, 2018). Pored navedenih studija sprovedenih *in vivo*, istraživanja sprovedena u uslovima *in vitro* su takođe uglavnom bila fokusirana na ispitivanje efekata DBP na nivou reproduktivnog sistema. Tako je pokazano da DBP utiče na funkciju Sertolijevih ćelija (Zhou i sar., 2020), spermatozoida (Xie i sar., 2019a) i granulosa ćelija jajnika (Adir i sar., 2017) u uslovima *in vitro*. Studija sprovedena na kulturi antrumskih folikula miševa u uslovima *in vitro* je pokazala da izlaganje DBP smanjuje rast antrumskih folikula, kao i da ispoljava povećanu citotoksičnost (Rasmussen i sar., 2017).

Epidemiološke studije koje su ispitivale uticaj ftalata na muški reproduktivni sistem su uočile da je povećanje koncentracije DBP praćeno smanjenjem koncentracije semene tečnosti (Radke i sar., 2018). Pored toga, DBP podstiče razvoj aneuploidije, a utiče i na morfologiju, motilnost i mobilnost spermatozoida (Mariana i sar., 2016; Radke i sar., 2018). Primećeno je da studije koje su detektovale niže koncentracije DBP pokazuju više statistički značajnih asocijacija između izloženosti DBP i reproduktivnih poremećaja od studija koje su detektovale više koncentracije ovog ftalata (Radke i sar., 2018). Pored toga, nekoliko studija je uočilo trend pada koncentracije testosterona kod muškaraca sa rastom detektovane koncentracije DBP u dozno-zavisnom maniru (Radke i sar., 2018). Rezultati nekoliko studija sprovedenih na mužjacima pacova, miševa i zečeva su pokazali da izlaganje DBP smanjuje nivo testosterona u serumu. Na mužjacima pacova je potvrđeno da DBP izaziva fiziološke poremećaje poput smanjene mase testisa i semenih vezikula, degenerativnih promena u testisima, blage hiperplazije Lajdigovih ćelija u seminiferim tubulama i degeneracije i atrofije tubula, kao i prisustvo višejedarnih germinativnih ćelija, smanjen broj i motilnost spermatozoida, smanjenu ili u potpunosti odsutnu spermatogenezu u većini seminiferim tubula i dr. (Czubacka i sar., 2021).

1.6.6. Efekti dibutil-ftalata na nivou kardiovaskularnog sistema

Toksični efekti DBP na nivou endokrinog i reproduktivnog sistema su detaljno izučeni u okviru mnogobrojnih epidemioloških studija, kao i studija sprovedenih *in vivo* i *in vitro* (Foster i sar., 2000; Mariana i sar., 2016; Wang i sar., 2019a; Xie i sar., 2019a), dok su efekti ovog ftalata na druge sisteme organa, uključujući i kardiovaskularni, opisani u malom broju studija. Uticaj DEHP, kao najzastupljenijeg ftalata, na kardiovaskularni sistem je ispitivan u mnogim studijama na miševima, pacovima, na humanim ćelijama u uslovima *in vitro*, kao i u epidemiološkim studijama, i ustanovljena je korelacija između izlaganja ovom ftalatu i razvoja endotelne disfunkcije, inflamacije

i ateroskleroze (Chang i sar., 2021). Sa druge strane, podaci o DBP u kontekstu endotelne disfunkcije i ateroskleroze su oskudni. Međutim, sve veći broj studija ukazuje na to da DBP može da utiče na funkciju kardiovaskularnog sistema i da može da poveća učestalost KVB (Mariana i Cairrao, 2020). Rezultati epidemioloških studija su pokazali pozitivnu korelaciju između izloženosti ftalatima i razvoja ateroskleroze i KVB poput ishemijske bolesti srca i bolesti srčanih arterija kako kod starijih, tako i kod mlađih ispitanika (Lind i Lind, 2012; Wiberg i sar., 2014; Su i sar., 2019a; 2019b; Wang i sar., 2020). Među retkim eksperimentalnim dokazima o štetnim efektima DBP na kardiovaskularni sistem su rezultati koje su objavili Wang i saradnici. Oni su ukazali na to da koncentracije DBP koje su prisutne u životnoj sredini utiču na povećanu akumulaciju lipida u humanim makrofagima (Wang i sar., 2020), što doprinosi razvoju ateroskleroze koja posledično vodi ka KVB. Osim toga, postoje studije koje su ukazale na uzročno-posledični odnos između prisustva metabolita DBP i drugih ftalata u serumu i metaboličkog sindroma koji obuhvata grupu poremećaja poput insulinske rezistencije, dislipidemije, hipertenzije i gojaznosti (pregledni rad Mariana i Cairrao, 2020), a koji spadaju među najznačajnije faktore rizika za razvoj KVB.

Broj studija sprovedenih na endotelnim ćelijama u uslovima *in vitro* koje su za cilj imale ispitivanje uticaja ftalata na funkciju ovih ćelija je relativno ograničen. Tako postoje određeni podaci o uticaju DEHP i njegovog metabolita, dok su podaci o uticaju DBP znatno ređi. Prema dostupnoj literaturi, efekat DBP je do sada praćen na endotelnim ćelijama krvnih sudova rožnjače (Krüger i sar., 2012) i endometrijuma (Bredhult i sar., 2007). Tako su Krüger i saradnici (2012) pokazali da izlaganje endotelne ćelijske linije rožnjače B4G12 DBP dovodi do smanjene proliferacije ćelija i citotoksičnosti, kao i do povećane ekspresije interleukina IL-1, IL-8 i IL-6. Bredhult i saradnici (2007) su na liniji humanih endotelnih ćelija krvnih sudova endometrijuma pokazali da DBP smanjuje proliferaciju ćelija. U našoj nedavno objavljenoj studiji smo prikazali eksperimentalne rezultate izlaganja humane makrovaskularne ćelijske linije EA.hy926 nanomolarnim koncentracijama DBP u trajanju od četiri nedelje, kao i bioinformatičku obradu dobijenih podataka u cilju identifikacije signalnih puteva, molekularnih funkcija, bioloških procesa i bolesti kod čoveka koje se mogu dovesti u vezu sa izlaganjem DBP. Fiziološkim testovima je utvrđeno da DBP povećava adheziju ćelija za ECM i da smanjuje migraciju endotelnih ćelija, kao i da povećava nivo iRNK za integrine. Identifikovane su tri najvažnije kategorije bolesti koje se mogu dovesti u vezu sa izlaganjem DBP i vaskularnom disfunkcijom: kardiovaskularne bolesti, cerebrovaskularne bolesti i bolesti imunskog sistema, čime je prvi put pokazano da izlaganje DBP predstavlja faktor rizika za pojavu različitih bolesti sa vaskularnom etiologijom (Stanic i sar., 2022). Još jedan značajan podatak o efektima DBP na nivou humanih endotelnih ćelija dolazi iz rezultata studije Kong i saradnika (2022) koji su pokazali da akutno izlaganje EA.hy926 ćelija nanomolarnim koncentracijama DBP dovodi do povećanog stvaranja i lučenja MCP-1 u ćelijski medijum, a koji je zatim korišćen kao hemoatraktant za regrutovanje humanih monocita THP-1.

Do sada nije opisan tačan mehanizam toksičnog uticaja DBP na razvoj i progresiju KVB i ostalih bolesti koje nastaju usled disfunkcije vaskularnog endotela. Osim jedne studije koja je ispitivala efekte DBP na pojavu hipertenzije kod miševa (Xie i sar., 2019b), gotovo u potpunosti nedostaju podaci iz studija sprovedenih *in vivo* i *in vitro* koji bi objasnili mehanizam delovanja DBP na vaskularni endotel, a to znanje je neophodno radi razumevanja efekata i opasnosti izlaganja vaskularnog sistema ovom ftalatu. Prethodnim radom (Stanic i sar., 2022) smo tek „zagrebali površinu“ ove teme, te uticaj DBP na endotelne ćelije i njihovu funkciju ostaje nepoznat. Stoga se uočava jasna potreba za sveobuhvatnim istraživanjima kojima bi se ispitaio uticaj DBP na endotelne ćelije, sa posebnim akcentom na dugotrajno izlaganje ćelija niskim koncentracijama DBP koje ima za cilj da u eksperimentalnim uslovima imitira realnu izloženost prosečnog čoveka. Pored toga, do sada nisu opisani signalni putevi koji se aktiviraju u humanim endotelnim ćelijama nakon izlaganja DBP. Ovakva istraživanja bi doprinela proširivanju saznanja o efektima koje ovaj ftalat ispoljava na nivou humanog endotela i kardiovaskularnog sistema u celini.

2. Ciljevi

U ovoj doktorskoj disertaciji su ispitivani efekti dugotrajnog i kratkotrajnog izlaganja humane endotelne ćelijske linije EA.hy926 odabranim fiziološki relevantnim koncentracijama BPA i DBP. S tim u vezi, postavljena su četiri cilja istraživanja:

✚ Ispitati efekat dugotrajnog izlaganja odabranim koncentracijama BPA na funkcijske i molekulske odgovore humanih endotelnih ćelija EA.hy926: metabolička aktivnost/vijabilnost, vezivanje monocita, vezivanje za želatin, migracija ćelija, propustljivost, stvaranje ROS i NO, relativna ekspresija gena za ICAM-1, VCAM-1 i E-selektin, proteine ključne u vezivanju monocita, kao i eNOS, enzima odgovornog za sintezu NO, ekspresija okludina i ZO-1, proteina koji imaju ulogu u održavanju integriteta polupropustljive endotelne barijere.

✚ Ispitati efekat kratkotrajnog izlaganja odabranim koncentracijama BPA na funkcijske i molekulske odgovore humanih endotelnih ćelija EA.hy926: metabolička aktivnost/vijabilnost, vezivanje monocita, vezivanje za želatin, migracija ćelija, propustljivost, stvaranje ROS i NO, relativna ekspresija gena za ICAM-1, VCAM-1, E-selektin i eNOS, kao i relativna ekspresija i aktivacija MMP-1, MMP-2 i MMP-9, enzima koji učestvuju u degradaciji ECM i time omogućuju migraciju endotelnih ćelija, ekspresija okludina i ZO-1. Poseban akcenat je stavljen na ispitivanje uloge receptora ER i GPER i signalnih puteva PI3K/Akt i ERK1/2 u stvaranju NO.

✚ Ispitati efekat dugotrajnog izlaganja odabranim koncentracijama DBP na funkcijske i molekulske odgovore humanih endotelnih ćelija EA.hy926: metabolička aktivnost/vijabilnost, vezivanje monocita, vezivanje za želatin, migracija ćelija, propustljivost, stvaranje ROS i NO, angiogeneza u uslovima *in vitro*, relativna ekspresija gena za ICAM-1, VCAM-1 i E-selektin, kao i eNOS i VEGFR-2, VEGF-A i VE-kadherin koji imaju ulogu u angiogenezi, ekspresija okludina i ZO-1.

✚ Ispitati efekat kratkotrajnog izlaganja odabranim koncentracijama DBP na funkcijske i molekulske odgovore humanih endotelnih ćelija EA.hy926: metabolička aktivnost/vijabilnost, vezivanje monocita, vezivanje za želatin, migracija ćelija, propustljivost, stvaranje ROS i NO, angiogeneza u uslovima *in vitro*, relativna ekspresija gena za ICAM-1, VCAM-1 i E-selektin, eNOS, VEGFR-2, VEGF-A i VE-kadherin, kao i relativna ekspresija i aktivacija MMP-1, MMP-2 i MMP-9, ekspresija okludina i ZO-1. Poseban akcenat je stavljen na ispitivanje uloge receptora ER i GPER i signalnih puteva PI3K/Akt i ERK1/2 u stvaranju NO.

3. Materijali i metode

3.1. Hemikalije

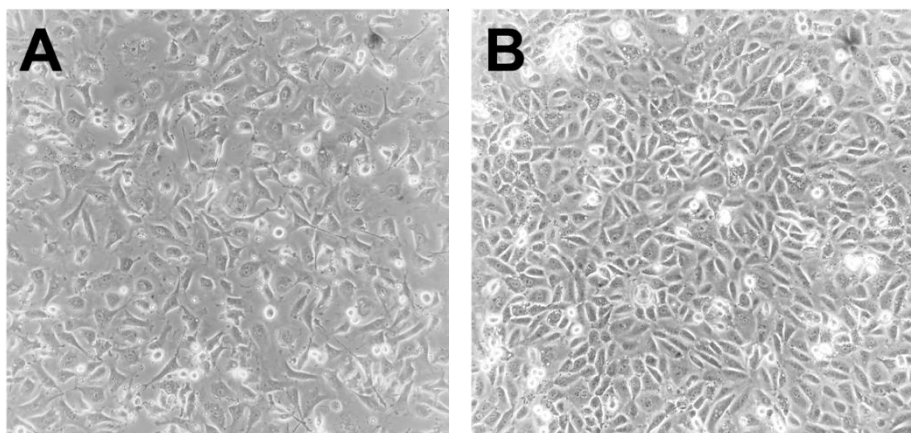
BPA (hemijaska čistoća $\geq 99\%$), DBP (hemijaska čistoća $\geq 99\%$), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sa 4 mM L-glutaminom i 4,5 g/L glukoze, medijum RPMI-1640 sa 2 mM L-glutaminom, 25 mM puferom HEPES (N-2-hidroksietilpiperazin-N-2-etansulfonska kiselina) i 4,5 g/L glukoze, rastvor penicilina (10.000 IU/mL) i streptomocina (10 mg/mL), sulforodamin B (SRB), trihlorsirćetna kiselina (TCA), dimetil-sulfoksid (DMSO), natrijumdodecil-sulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate*, SDS), natrijum-azid, natrijum-deoksiholat, natrijum-piruvat, natrijum-fluorid, natrijum-ortovanadat, etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), 0,25% rastvor tripsin-EDTA, albumin iz goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumin*, BSA), želatin poreklom iz svinjske kože, rastvor Hanks' Balanced Salt (HBSS), fluorescein-izotiocijanat (FITC)-dekstran (FD40, Mw 40 kDa), 2',7'-dihlorodihidrofluorescein-diacetat (H₂DCFDA), fibronektin iz goveđe plazme (1 mg/mL u 0,05 M puferu Tris, pH 7,5), Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250, Triton X-100, inhibitori proteaza Roche Complete EDTA-free, N ω -nitro-L-arginin-metil-estar (L-NAME), ICI 182,780, U0126, i vortmanin su nabavljeni od Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Nemačka). Od Lonza (Walkersville, MD, SAD) je nabavljen 0,4% rastvor tripan plavog (eng. *Trypan blue*) u 0,85% NaCl. Sterilni fetalni goveđi serum (eng. *fetal bovine serum*, FBS), HEPES, suplement HAT (5 mM natrijum-hipoksantin, 20 μ M aminopterin, 0,8 mM timidin), TNF- α , kalcein AM, Pierce BCA Protein Assay Kit, SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard, reagens TRIzol i reagens alamarBlue™ Cell Viability su kupljeni od Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SAD). NZYol, reagens za izolovanje RNK, je kupljen od NZYTech (Lisabon, Portugalija). High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit za reverznu transkripciju i Power SYBR Green PCR Master Mix za RT-qPCR su nabavljeni od Applied Biosystems (Foster City, CA, SAD). Inhibitor G-15 je kupljen od Tocris/Bio-Techne (Minneapolis, MN, SAD), dok je Cultrex Reduced Growth Factor Basement Membrane Extract, PathClear kupljen od R&D Systems/Bio-Techne (Minneapolis, MN, SAD). Primarno zečje poliklonsko antitelo protiv eNOS je nabavljeno od FineTest (Wuhan, Kina), dok je primarno zečje monoklonsko antitelo protiv fosfo-eNOS (specifično detektuje fosforilaciju eNOS na poziciji Ser1177) od Invitrogen-Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SAD). Primarna zečja poliklonska antitela protiv fosfo-Akt (Ser473), Akt i fosfo-p44/42 MAPK (ERK1/2) i primarno zečje monoklonsko antitelo protiv gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) su kupljeni od Cell Signaling Technology (Danvers, MA, SAD). Primarno mišje monoklonsko antitelo protiv okludina i zečje poliklonsko antitelo protiv ERK2 su kupljeni od Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, SAD), dok je primarno kozje monoklonsko antitelo protiv ZO-1 od Abcam (Cambridge, UK). Sekundarna antitela vezana za peroksidazu rena, i to protiv mišjih, zečjih i kozjih primarnih antitela, su kupljena od Bio-Rad (Hercules, CA, SAD). VECTASHIELD® PLUS Antifade Mounting Medium with DAPI nabavljen je od Vector Laboratories (Newark, CA, SAD). Ostale hemikalije su bile analitičke čistoće.

3.2. Gajenje ćelija u kulturi

3.2.1. Ćelijska linija EA.hy926

Ćelijska linija na kojoj je ispitivan uticaj kratkotrajnog (akutnog) i dugotrajnog (hroničnog) izlaganja BPA i DBP je kontinuirana ćelijska linija EA.hy926 (ATCC® CRL-2922, www.atcc.org), nastala fuzijom HUVEC sa klonom kontinuirane ćelijske linije humanog adenokarcinoma pluća A549 rezistentnim na tioguanin nakon izlaganja polietilen-glikolu (Edgell i sar., 1983). EA.hy926 ćelije (slika 3.1) su po morfologiji epitelne, adherentne ćelije koje pri dovoljnoj gustini formiraju kontinuirani jednosloj. EA.hy926 ćelije ispoljavaju morfološke, fenotipske i funkcijske karakteristike humanih makrovaskularnih endotelnih ćelija (Edgell i sar., 1990; Ahn i sar., 1995),

ali za razliku od primarnih endotelnih ćelija imaju sposobnost da se neograničeno dele i proliferišu, te stoga predstavljaju pogodan model za ispitivanja funkcijskih i molekulskih promena na endotelnim ćelijama u uslovima *in vitro*, naročito tokom dužeg vremenskog perioda.



Slika 3.1. Izgled EA.hy926 ćelija pod invertnim svetlosnim mikroskopom. Ćelije su konfluentne (A) ~30% i (B) ~90%.

EA.hy926 ćelije su gajene u sterilnim flaskovima kao jednoslojna kultura u DMEM sa 4,5 g/L glukoze i 4 mM L-glutaminom kome su dodavane sledeće komponente: 10% FBS, 1% penicilin-streptomycin, 1,5 g NaHCO₃, 0,11 g/L natrijum-piruvat, 10 mM HEPES i 4% HAT. Medijum sa svim dodatim komponentama će se u daljem tekstu nazivati kompletnim medijumom. Ćelije su za potrebe ispitivanja uticaja dugotrajnog izlaganja gajene u sterilnim flaskovima površine 25 cm² (T-25), dok su za potrebe kratkotrajnih tretmana gajene u sterilnim flaskovima površine 75 cm² (T-75). Ćelije u flaskovima su gajene u CO₂ inkubatoru, u strogo kontrolisanim uslovima, na temperaturi od 37 °C, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Medijum je menjan svaka tri ili četiri dana, tokom pasažiranja ćelija. Ćelije su pasažirane nakon što su zauzimale 80–90% površine flaska. Pasažiranje je započinjano uklanjanjem medijuma iz flaska i ispiranjem ćelija sa 10 mL fiziološkog rastvora puferisanog fosfatnim puferom (eng. *phosphate-buffered saline*, PBS; 140 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) u cilju uklanjanja ostataka medijuma i FBS koji sadrži inhibitore tripsina. U cilju odlepljivanja ćelija sa površine flaska dodavano je 1 ili 2 mL 0,25% rastvora tripsin-EDTA (1 mL kada su ćelije gajene u flaskovima T-25, odnosno 2 mL kada su gajene u flaskovima T-75), u kom su ćelije inkubirane 3 min na 37°C. Nakon što su se ćelije odlepile, u flask je dodavana 2,5 puta veća zapremina kompletnog medijuma od početne zapremine rastvora tripsin-EDTA, dakle 2,5 mL kompletnog medijuma u flask T-25, odnosno 5 mL u flask T-75. Suspenzija ćelija je potom homogenizovana provlačenjem kroz pipetu više puta, a zatim prebacivana u tubu i centrifugirana 5 min na 400 xg. Supernatant je potom uklanjnjan iz tube, a talog ćelija resuspendovan u svežem kompletnom medijumu (4 mL kada su ćelije gajene u flaskovima T-25, odnosno 10 mL kada su gajene u flaskovima T-75). Broj ćelija u suspenziji određivan je testom TBE (eng. *trypan blue exclusion assay*) koji se zasniva na tome da mrtve ili oštećene ćelije kod kojih je narušen integritet ćelijske membrane usvajaju rastvor tripan plavog pri čemu se boje, dok žive vitalne ćelije ostaju nebojene. Rastvor tripan plave boje (0,4%) i suspenzija ćelija mešani su u odnosu 1:1, a potom je izdvajan alikvot bojene suspenzije od 10 μL i nanošen u obe Neubauerove komore (eng. *Neubauer chamber*) hemocitometra. Žive ćelije su brojane u A kvadratima komora pri uvećanju 100x na invertnom svetlosnom mikroskopu. Broj ćelija u 1 mL suspenzije je dobijan množenjem srednje vrednosti broja ćelija u obe komore, razblaženja suspenzije za brojanje i 10⁴. Tokom izrade disertacije je nabavljen automatski brojač Luna II, te je test TBE rađen pomoću ovog brojača tako što je alikvot bojene suspenzije od 10 μL nanošen na pločicu za brojanje. Automatskim brojačem je potom određivan broj živih ćelija u 1 mL suspenzije, kao i procenat vijabilnosti. Posle brojanja je u flaskove T-25 prebacivano po 0,45 x 10⁶ ćelija (za četiri dana u kulturi) ili 0,75 x 10⁶

ćelija (za tri dana u kulturi) u ukupnoj zapremini kompletnog medijuma od 6 mL. U flaskovima T-25 su ćelije gajene za potrebe dugotrajnog izlaganja ćelija BPA i DBP, te su naredna 3 h ćelije ostavljane u inkubatoru kako bi se zalepile za dno flaska, nakon čega su dodavani odgovarajući tretmani prema protokolu opisanom u potpoglavlju 3.3.1. Posle brojanja ćelija za potrebe kratkotrajnog izlaganja ćelija BPA i DBP je u flaskove T-75 prebacivano po $1,5 \times 10^6$ ćelija (za četiri dana u kulturi) ili $2,5 \times 10^6$ ćelija (za tri dana u kulturi).

3.2.2. Ćelijska linija U937

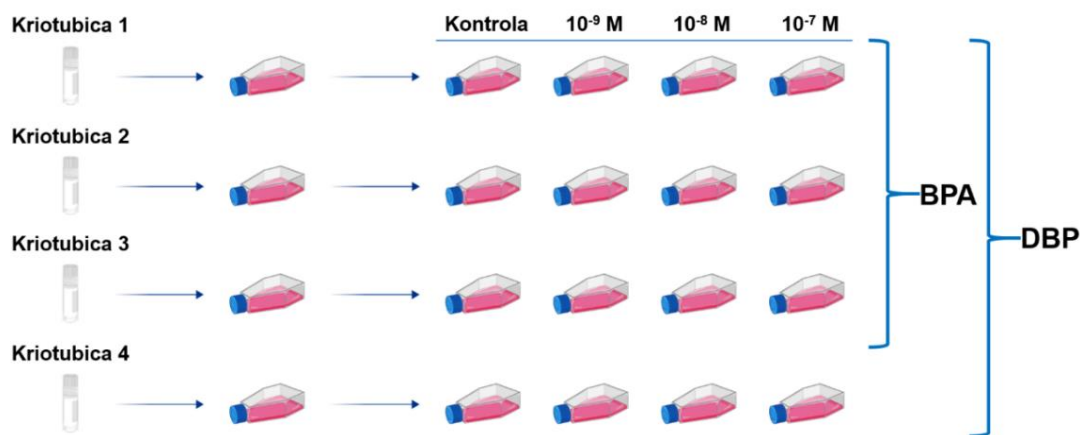
U937 je kontinuirana ćelijska linija humanih monocita. U937 ćelije su korišćene u eksperimentima u kojima je ispitivano vezivanje monocita za endotelne ćelije. U937 ćelije su gajene u suspenziji na temperaturi od 37°C , u vlažnoj atmosferi sa 5% CO_2 u medijumu RPMI-1640 sa 4,5 g/L glukoze i dodanim sledećim komponentama: 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, 2,2 g/L NaHCO_3 i 0,11 g/L natrijum-piruvat. Ćelije su pasažirane kada su dostizale gustinu od $1,5 \times 10^6$ - 2×10^6 ćelija po 1 mL tako što je suspenzija ćelija centrifugirana 6 min na 300 xg, a potom je talog ćelija resuspendovan u svežem medijumu. Broj ćelija u suspenziji je određivan kao što je opisano u potpoglavlju 3.2.1. Deo ćelija je potom korišćen za potrebe eksperimenta, a deo je vraćan u flask u gustini od oko $0,2 \times 10^6$ ćelija po mL u cilju dalje propagacije ćelijske kulture.

3.3. Izlaganje EA.hy926 ćelija bisfenolu A i dibutil-ftalatu

3.3.1. Dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija bisfenolu A i dibutil-ftalatu

EA.hy926 ćelije iz kriotubica poreklom od tri ili četiri različita datuma zamrzavanja su odmrzavane za potrebe dugotrajnog izlaganja ćelija BPA ili DBP, redom, i gajene u odvojenim flaskovima T-25 tokom dve nedelje (na način opisan u potpoglavlju 3.2.1), nakon čega su ćelije iz svakog pojedinačnog flaska raspoređivane u po četiri flaska T-25 – jedan je predstavljao kontrolni flask, a ćelije u preostala tri flaska su izlagane različitim koncentracijama BPA ili DBP. Na taj način je od svake kriotubice dobijena po jedna kontrolna i tri tretirane grupe ćelija, odnosno dobijena su po tri ili četiri nezavisna ponavljanja (biološka replikata) kontrole i tretmana, te je ukupan broj flaskova u eksperimentu bio 12 za potrebe ispitivanja uticaja dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija BPA, odnosno 16 za eksperiment u kom su ćelije izlagane DBP (slika 3.2). Ćelije su pasažirane dva puta nedeljno, utorkom i petkom, kada je u flaskove vraćano po $0,75 \times 10^6$ i $0,45 \times 10^6$ ćelija, redom.

Za potrebe dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija BPA, ćelije koje su predstavljale kontrolu su direktno u flasku bile izlagane rastvaraču (0,1% apsolutni etanol), dok su preostale grupe ćelija bile izlagane odabranim koncentracijama BPA – 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M. Radni rastvori BPA su pravljani tako što je BPA, čvrsta supstanca molarne mase 228,29 g/mol, rastvaran u apsolutnom etanolu u tri sukcesivna razblaženja pri čemu su dobijena tri radna rastvora sledećih koncentracija: 10^{-4} M, 10^{-5} M i 10^{-6} M BPA. Radni rastvori su prilikom dodavanja tretmana u flaskove razblaživani u kompletnom medijumu 1.000 puta do finalnih koncentracija 10^{-7} M, 10^{-8} M i 10^{-9} M BPA. Koncentracija apsolutnog etanola u kontroli je odgovarala koncentraciji u svim tretmanima i nije prelazila 0,1%.



Slika 3.2. Šematski prikaz raspodele EA.hy926 ćelija iz kriotubica u flaskove za potrebe dugotrajnog izlaganja ćelija odabranim koncentracijama bisfenola A i dibutil-ftalata (10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M). Slika je kreirana u programu BioRender (<https://www.biorender.com>).

Za potrebe dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija DBP, ćelije koje su predstavljale kontrolu su direktno u flasku bile izlagane rastvaraču (0,05% DMSO), dok su preostale grupe ćelija bile izlagane odabranim koncentracijama DBP – 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M. Sukcesivnim razblaživanjem osnovnog rastvora DBP (3,772 M) u DMSO su pripremana tri radna rastvora sledećih koncentracija: 2×10^{-4} M, 2×10^{-5} M i 2×10^{-6} M DBP. Radni rastvori su prilikom dodavanja tretmana u flaskove razblaživani u potpunom medijumu 2.000 puta do finalnih koncentracija 10^{-7} M, 10^{-8} M i 10^{-9} M DBP. Koncentracija DMSO u kontroli odgovarala je koncentraciji u svim tretmanima i nije prelazila 0,05%.

Tokom dugotrajnog izlaganja ćelija BPA u trajanju od 14 nedelja i DBP u trajanju od 12 nedelja, EA.hy926 ćelije su izlagane nanomolarnim koncentracijama BPA, odnosno DBP (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M u potpunom medijumu) i rastvaraču (kompletan medijum sa 0,1% apsolutnim etanolom, odnosno 0,05% DMSO) četiri puta nedeljno: dva puta prilikom pasažiranja ćelija, utorkom i petkom, i dva puta tokom gajenja ćelija između dve pasaže, ponedeljkom i četvrtkom. Na taj način je postignuto dugotrajno ponavljano izlaganje ćelija BPA i DBP sa ciljem da se u eksperimentalnim uslovima imitira realna hronična izloženost prosečnog čoveka ovim EDC. Tretmani su utorkom i petkom u flaskove dodavani 3 h nakon pasažiranja ćelija, kako bi se izbegao efekat tretmana na vezivanje ćelija za podlogu.

Koncentracije BPA su odabirane na osnovu realne izloženosti ljudi u radnom i životnom okruženju i na osnovu detektovanih koncentracija BPA u serumu i plazmi ispitanika iz opšte ljudske populacije (Kaddar i sar., 2009; pregledni rad Vandenberg i sar., 2010; Posnack, 2014; pregledni rad Jalal i sar., 2018). Koncentracija BPA od 10^{-7} M je uzimana kao gornji limit, odnosno najviša koncentracija koja se može primeniti kao niska koncentracija u studijama koje se sprovedu u uslovima *in vitro* (Wetherill i sar., 2007).

Koncentracije DBP su odabirane na osnovu realne izloženosti ljudske populacije ovom EDC (Reddy i sar., 2006; Högberg i sar., 2008) i prisustva MBP, glavnog metabolita DBP, u humanoj plazmi i urinu (Silva i sar., 2003; Becker i sar., 2009; Saravanabhavan i sar., 2013; Geens i sar., 2014; Gomez Ramos i sar., 2016). Koncentracija DBP od 10^{-7} M je uzimana za gornji limit koji se smatra niskom koncentracijom za potrebe sprovođenja studija u uslovima *in vitro*, po uzoru na princip primenjen kod studija sa BPA (Wetherill i sar., 2007).

3.3.2. Kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija bisfenolu A i dibutil-ftalatu

Za potrebe ispitivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija BPA i DBP, ćelije su gajene u flaskovima u standardnim uslovima, a pri pasažiranju su sađene u odgovarajuće ploče za ćelijske kulture ili Petri posude, gde su potom izlagane odabranim koncentracijama BPA ili DBP. EA.hy926 ćelije su gajene u flaskovima T-75 u kompletnom medijumu kako je prethodno opisano u potpoglavlju 3.2.1. Ćelije su pasažirane dva puta nedeljno, ponedeljkom i petkom, pri čemu je u flask, za potrebe propagacije ćelijske kulture, vraćano po $1,5 \times 10^6$ i $2,5 \times 10^6$ ćelija, redom. Ćelije su za potrebe kratkotrajnih izlaganja sađene ponedeljkom u odgovarajuće ploče za ćelijske kulture ili Petri posude, a zatim su nakon 24 h u medijum dodavani odgovarajući tretmani, prema protokolu opisanom u narednim pasusima.

Za potrebe kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija BPA, ćelije koje su predstavljale kontrolu su u bunarićima odgovarajuće ploče za ćelijske kulture ili Petri posudama bile izlagane rastvaraču (0,1% apsolutni etanol), dok su preostale grupe ćelija bile izlagane odabranim koncentracijama BPA – 10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M. Radni rastvori BPA su pravljeni tako što je BPA, čvrsta supstanca molarne mase 228,29 g/mol, rastvaran u apsolutnom etanolu u tri sukcesivna razblaženja pri čemu su dobijena tri radna rastvora sledećih koncentracija: 10^{-2} M, 10^{-3} M i 10^{-4} M BPA. Radni rastvori su prilikom dodavanja tretmana u bunariće ili posude razblaživani u kompletnom medijumu 1.000 puta do finalnih koncentracija 10^{-5} M, 10^{-6} M i 10^{-7} M BPA. Koncentracija apsolutnog etanola u kontroli je odgovarala koncentraciji u svim tretmanima i nije prelazila 0,1%.

Za potrebe kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija DBP, ćelije koje su predstavljale kontrolu su u bunarićima odgovarajuće ploče za ćelijske kulture ili Petri posudama bile izlagane rastvaraču (0,05% DMSO), dok su preostale grupe ćelija bile izlagane odabranim koncentracijama DBP – 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M. Sukcesivnim razblaživanjem osnovnog rastvora DBP (3,772 M) u DMSO su pripremana tri radna rastvora sledećih koncentracija: 2×10^{-1} M, 2×10^{-2} M i 2×10^{-3} M DBP. Radni rastvori su prilikom dodavanja tretmana u bunariće ili posude razblaživani u kompletnom medijumu 2.000 puta do finalnih koncentracija 10^{-4} M, 10^{-5} M i 10^{-6} M DBP. Koncentracija DMSO u kontroli odgovarala je koncentraciji u svim tretmanima i nije prelazila 0,05%.

EA.hy926 ćelije su izlagane odabranim koncentracijama BPA ili DBP u trajanju od 15 min do 48 h, u zavisnosti od postavke eksperimenta (detaljnije opisano u narednim poglavljima). Za potrebe eksperimenata u kojima su EA.hy926 ćelije kratkotrajno izlagane odabirane su koncentracije BPA koje odgovaraju akutnom trovanju ljudi ili izlaganju ovom EDC u posebnim okolnostima (neonatalna intenzivna nega, pacijenti na dijalizi, industrijski radnici i dr.) (Krieter i sar., 2013; Posnack, 2014). Koncentracije DBP koje su korišćene u eksperimentima u kojima su EA.hy926 ćelije kratkotrajno izlagane su više od fizioloških, odnosno više od koncentracija kojima su ljudi rutinski izloženi u životnom okruženju, međutim pokazano je da upravo ove visoke koncentracije odgovaraju koncentracijama DBP kojima industrijski i drugi radnici mogu biti profesionalno izloženi na radnom mestu (Johns i sar., 2015; pregledni rad Fréry i sar., 2020).

3.4. Ispitivanje metaboličke aktivnosti ćelija testom sa bojom alamarBlue™

Za procenu citotoksičnosti odabranih koncentracija BPA i DBP, kojima su dugotrajno ili kratkotrajno izlagane EA.hy926 ćelije, korišćen je test sa bojom alamarBlue™. Test se zasniva na detekciji fluorescentnog signala redukovane boje alamarBlue™ (resazurina) koji potiče od živih, metabolički aktivnih ćelija. Resazurin je jedinjenje plave boje, nefluorescentno i netoksično u svom oksidovanom obliku. Nakon ulaska u žive ćelije, resazurin se redukuje do rezorufina, jedinjenja crvene boje koje odlikuje visok nivo fluorescencije. Merenjem fluorescencije mogu se detektovati

promene u metaboličkoj aktivnosti ćelija, a što se posredno može dovesti u vezu sa vijabilnošću ćelija, budući da su vijabilne ćelije metabolički aktivnije.

Za potrebe ispitivanja uticaja dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na vijabilnost ćelija, EA.hy926 ćelije su uzimane iz svakog flaska nakon dve, četiri, osam, dvanaest i četrnaest nedelja izlaganja BPA, odnosno tri, šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja DBP, a zatim sađene u ploču sa 96 bunarića, $2,5 \times 10^4$ ćelija u 150 μL kompletnog medijuma u osam bunarića. Nakon lepljenja ćelija u trajanju od 3 h na 37°C na postojeći medijum u odgovarajućim bunarićima je dodavano po 50 μL razblaženih radnih rastvora BPA, odnosno DBP i odgovarajuće kontrole da bi se dobile odgovarajuće finalne koncentracije tretmana. Posle 48 h, medijum je uklanjan multikanalnom pipetom, nakon čega je u svaki bunarić dodavano po 70 μL 10% rastvora boje alamarBlue™ koji je pripreman u kompletnom medijumu. Pored toga, u osam bunarića bez ćelija je dodavana ista zapremina 10% rastvora boje alamarBlue™ u kompletnom medijumu kako bi se izmerio fluorescentni signal koji potiče od same boje. Ploča je zatim inkubirana 2 h u mraku na 37°C , nakon čega su rezultujuće fluorescencije merene na fluorimetru Thermo LabSystems Fluoroskan Ascent sa prethodno podešenim talasnim dužinama: talasna dužina ekscitacije $\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$ i talasna dužina emisije $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$. Signal poreklom od alamarBlue™ (bez ćelija) oduziman je od vrednosti dobijenih u svim tretiranim bunarićima (sa ćelijama). Kvantifikacija dobijenih rezultata urađena je na taj način što je za svaki tretman i kontrolu računata srednja vrednost fluorescentnog signala, a potom je metabolička aktivnost EA.hy926 ćelija izražavana kao procenat metaboličke aktivnosti ćelija u odnosu na kontrolu.

Za potrebe ispitivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na vijabilnost ćelija za svaki tretman i kontrolu u ploču sa 96 bunarića sađeno je po 2×10^4 ćelija u 150 μL kompletnog medijuma u osam bunarića. Nakon 24 h, na postojeći medijum u odgovarajućim bunarićima je dodavano po 50 μL razblaženih radnih rastvora BPA, odnosno DBP i odgovarajuće kontrole kako bi se postigle odgovarajuće finalne koncentracije tretmana. Posle 24 i 48 h, medijum je pažljivo uklanjan multikanalnom pipetom, nakon čega je u svaki bunarić dodavano po 70 μL 10% rastvora boje alamarBlue™ u kompletnom medijumu. U svaki eksperiment je uključeno i određivanje fluorescencije poreklom od same boje alamarBlue™, kao što je opisano u prethodnom pasusu. Izmeren je intenzitet fluorescentnog signala, a zatim je kvantifikacija dobijenih rezultata urađena na prethodno opisan način.

3.5. Ispitivanje vezivanja monocita za endotelne ćelije

Za procenu uticaja dugotrajnog i kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na vezivanje monocita korišćen je test vezivanja humanih monocita U937 za jednosloj endotelnih ćelija. Test se zasniva na detekciji fluorescentnog signala poreklom od U937 ćelija obeleženih fluorescentnom bojom kalcein AM nakon vezivanja za jednosloj EA.hy926 ćelija. Merenjem fluorescencije, odnosno određivanjem broja vezanih monocita, mogu se detektovati promene u hemoatrakciji monocita od strane EA.hy926 ćelija, što se posredno može dovesti u vezu sa aktivacijom endotelnih ćelija.

Za potrebe ispitivanja uticaja dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na vezivanje monocita za jednosloj endotelnih ćelija, EA.hy926 ćelije su uzimane iz svakog flaska nakon pet, devet i četrnaest nedelja izlaganja BPA, odnosno tri, šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja DBP, a zatim sađene u Petri posude prečnika 35 mm (u daljem tekstu: 35 mm posude), $0,75 \times 10^6$ ćelija u 1,5 mL kompletnog medijuma po 35 mm posudi. Nakon lepljenja ćelija u trajanju od 3 h na 37°C , na postojeći medijum u odgovarajućim 35 mm posudama je dodavano po 1,5 mL razblaženih radnih rastvora BPA, odnosno DBP i odgovarajuće kontrole da bi se dobile odgovarajuće finalne koncentracije tretmana. Na ovaj način su dugotrajni tretmani nastavljeni u pločama narednih 48 h. U eksperimentu sa BPA je u četrnaestoj nedelji izlaganja

EA.hy926 ćelija zasađeno dva seta posuda, odnosno od svakog flaska su ćelije zasađene u po dve 35 mm posude. Drugi set posuda je, osim što je izlagan odgovarajućim tretmanima, dodatno stimulisan sa proinflamacijskim citokinom TNF- α u koncentraciji od 10 ng/mL, budući da se monociti vezuju za endotelne ćelije u uslovima inflamacije. Stimulacija sa TNF- α je trajala 24 h pre izvođenja eksperimenta, odnosno dodavanja monocita U937 obeleženih kalceinom AM.

U937 ćelije su obeležavane fluorescentnom bojom kalcein AM neposredno pred izvođenje eksperimenta tako što je odgovarajući broj ćelija inkubiran 30 min na 37°C u rastvoru boje kalcein AM. Korišćeno je 10 μ L kalcein AM koncentracije 1 mg/mL u 1 mL medijuma RPMI-1640 bez seruma za 10×10^6 ćelija da bi se dobila finalna koncentracija boje od 1 μ g/mL; količina je preračunavana spram broja U937 ćelija potrebnih za izvođenje eksperimenta. Nakon isteka inkubacije, ćelije su centrifugirane 5 min na 300 xg, supernatant je potom uklanjan i ćelije ispirane tri puta rastvorom PBS, po 5 mL u svakom ispiranju, kako bi se isprala nevezana boja kalcein AM. Između ispiranja su ćelije centrifugirane 5 min na 300 xg. Nakon poslednjeg ispiranja su ćelije resuspendovane u medijumu RPMI-1640 sa 10% FBS (2×10^6 ćelija je resuspendovano u 1 mL medijuma; zapremina medijuma je preračunavana spram broja U937 ćelija). EA.hy926 ćelije u 35 mm posudama su ispirane dva puta rastvorom HBSS, 2 mL po posudi, nakon čega je suspenzija U937 ćelija obeleženih bojom kalcein AM dodavana preko EA.hy926 ćelija u 35 mm posudama (2×10^6 U937 ćelija po posudi). Ploče su potom inkubirane 1 h na 37°C. Nakon isteka inkubacije, ploče su ispirane dva puta rastvorom HBSS, 2 mL po posudi, u cilju uklanjanja nevezanih monocita. Nakon poslednjeg ispiranja je u svaku 35 mm posudu dodavano po 1 mL rastvora HBSS. Potom su fluorescentno obeležene U937 ćelije vezane za jednosloj EA.hy926 ćelija fotografisane na fluorescentnom mikroskopu Axio Imager.A2 (Zeiss, White Plains, NY, SAD) uz korišćenje odgovarajućeg filtera (FITC). Kvantifikacija dobijenih vidnih polja je urađena korišćenjem programa NIH Image J (<https://Image.J.nih.gov/>) na taj način što su na fotografijama sa fluorescentnog mikroskopa brojane U937 ćelije obeležene fluorescentnom bojom kalcein AM. Za svaki tretman i kontrolu je računata srednja vrednost boja vezanih U937 ćelija, a potom je vezivanje monocita za jednosloj endotelnih ćelija izražavano kao procenat U937 ćelija koje su se vezale za EA.hy926 ćelije u odnosu na kontrolu.

Za potrebe ispitivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na vezivanje monocita za jednosloj endotelnih ćelija, za svaki tretman i kontrolu je u 35 mm posude sađeno po $0,75 \times 10^6$ ćelija u 2 mL kompletnog medijuma, po jedna 35 mm posuda za svaki tretman (za određivanje vezivanja monocita pomoću fluorescentnog mikroskopa) ili je u ploču sa 96 bunarića sađeno po $2,5 \times 10^4$ ćelija u 150 μ L kompletnog medijuma, po 8 bunarića za svaki tretman (za određivanje vezivanja monocita pomoću fluorimetra). Posude i ploče su potom odlagane u inkubator na 37°C. Nakon 24 h, iz 35 mm posuda je uklanjan medijum i dodavano je po 3 mL odgovarajućih tretmana BPA ili DBP u kompletnom medijumu, dok je iz ploča sa 96 bunarića takođe uklanjan medijum i dodavano je po 200 μ L odgovarajućih tretmana BPA ili DBP u kompletnom medijumu. Posude i ploče su odlagane u inkubator na 37°C tako da je izlaganje BPA trajalo 48 h, a izlaganje DBP 24 h. U pojedinim eksperimentima sa DBP, gde je to naznačeno, EA.hy926 ćelije su tokom 45 min pretretirane sa: antagonistom ER ICI 182,780 (5 μ M), antagonistom GPER G-15 (5 μ M), inhibitorom MEK1/2 U0126 (5 μ M) i inhibitorom PI3K vortmaninom (1 μ M). Po isteku tretmana su U937 ćelije obeležavane bojom kalcein AM neposredno pred izvođenje eksperimenta kao što je prethodno objašnjeno i potom su stavljane preko jednosloja EA.hy926 ćelija u posudama ili pločama (2×10^6 ćelija po 35 mm posudi ili $0,5 \times 10^6$ ćelija po jednom bunariću ploče sa 96 bunarića). Nakon inkubacije na 37°C u trajanju od 1 h, posude i ploče su ispirane dva puta rastvorom HBSS (2 mL po 35 mm posudi ili 200 μ L po jednom bunariću ploče sa 96 bunarića), u cilju uklanjanja nevezanih monocita. Potom su fluorescentno obeležene U937 ćelije vezane za jednosloj EA.hy926 ćelija u 35 mm posudama fotografisane na fluorescentnom mikroskopu, a dobijeni rezultati kvantifikovani kao što je već opisano. Intenzitet fluorescencije u pločama sa 96 bunarića meren je na fluorimetru Thermo LabSystems Fluoroskan Ascent sa prethodno podešenim talasnim dužinama: talasna dužina

ekscitacije $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ i talasna dužina emisije $\lambda_{\text{em}} = 538 \text{ nm}$. Kvantifikacija rezultata dobijenih pomoću fluorimetra rađena je na taj način što je za svaki tretman i kontrolu računata srednja vrednost fluorescentnog signala poreklom od vezanih U937 ćelija obeleženih fluorescentnom bojom kalcein AM, a potom je vezivanje monocita za jednosloj endotelnih ćelija izraženo kao procenat U937 ćelija koje su se vezale za EA.hy926 ćelije u odnosu na kontrolu.

3.6. Ispitivanje vezivanja ćelija za želatin

Za procenu uticaja odabranih koncentracija BPA i DBP na vezivanje endotelnih ćelija za komponente ECM korišćen je test vezivanja EA.hy926 ćelija za želatin.

Za potrebe ispitivanja dugotrajnog efekta oba EDC na vezivanje endotelnih ćelija za proteine ECM, EA.hy926 ćelije su uzimane iz svakog flaska nakon pet, devet i četrnaest nedelja izlaganja BPA, odnosno tri, šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja DBP, po $0,5 \times 10^6$ ćelija od svakog flaska. Ćelije su zatim centrifugirane 5 min na 400 xg nakon čega je supernatant uklanjan. Talog ćelija je resuspendovan u 1 mL rastvora PBS, ponovo centrifugiran i potom resuspendovan u 1,25 mL pufera za adheziju (DMEM bez seruma, pH 7,4, sa 0,5% BSA, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ i 0,2 mM MnCl₂). U pufer za adheziju su pre dodavanja ćelija dodavani i odgovarajući tretmani, kako bi se izlaganje nastavilo i tokom eksperimenta. Po 1 mL suspenzije ćelija u puferu za adheziju je sađeno u ploče sa 12 bunarića koje su prethodno obložene želatinom. Oblaganje želatinom je podrazumevalo sledeće: dan pre eksperimenta su bunarići ploča oblagani želatinom tako što je po 0,5 mL 1% rastvora želatina dodavano u svaki bunarić i ostavljano da stoji 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije je želatin uklanjan, a ploča ostavljena da se bunarići osuše 45 min na sobnoj temperaturi. Bunarići su potom ispirani rastvorom PBS, 1 mL po bunariću, i ostavljani do upotrebe. Na dan eksperimenta, ploče su blokirane rastvorom 1% BSA u PBS, 1 mL po bunariću. Blokiranje je trajalo najmanje 1 h nakon čega je rastvor uklanjan, a bunarići ispirani rastvorom PBS, 1 mL po bunariću. Zatim je po bunariću sađeno $0,4 \times 10^6$ ćelija iz svakog flaska u 1 mL pufera za adheziju. Ploče su potom inkubirane na 37°C u trajanju od 30 min. Nakon isteka inkubacije ćelije su tri puta pažljivo ispirane čistim medijumom, 1 mL po bunariću, i potom fotografisane na invertnom svetlosnom mikroskopu. Broj vezanih ćelija za želatin je zatim kvantifikovan pomoću testa sa bojom SRB (opisano u poglavlju 3.7), a vezivanje ćelija za ECM je izraženo kao procenat EA.hy926 ćelija koje su se vezale za želatin u odnosu na kontrolu.

Za potrebe ispitivanja kratkotrajnog delovanja BPA i DBP na EA.hy926 ćelije i njihovo vezivanje za komponente ECM, za svaki tretman i kontrolu je u 35 mm posude sađeno po $1,5 \times 10^6$ ćelija u 2 mL kompletnog medijuma po posudi, jedna 35 mm posuda za svaki tretman. Sledećeg dana je u posude dodavano po 2 mL odgovarajućih tretmana BPA ili DBP u kompletnom medijumu uz prethodno uklanjanje postojećeg medijuma iz posude. Nakon 24 h izlaganja ćelije su ispirane dva puta rastvorom PBS u zapremini od 2 mL, a zatim je dodavano 0,5 mL tripsina po posudi. Ćelije su u rastvoru tripsina inkubirane 3 min na 37°C. Nakon isteka inkubacije u posude je dodavano po 1,5 mL kompletnog medijuma kako bi se zaustavilo delovanje tripsina. Suspenzija ćelija je mešana nekoliko puta provlačenjem kroz pipetu, a potom centrifugirana 5 min na 400 xg. Nakon centrifugiranja je uklanjan supernatant, talog ćelija je resuspendovan u 3 mL rastvora PBS, a zatim ponovo centrifugiran 5 min na 400 xg. Supernatant je potom uklanjan, a talog ćelija resuspendovan u 1,5 mL pufera za adheziju. Ćelije su potom brojane, po $0,6 \times 10^6$ ćelija je odvajano u poseban set tubica, a zapremina je dopunjena do 1,5 mL puferom za adheziju. U pufer za adheziju sa suspenzijom ćelija su dodavani i odgovarajući tretmani, kako bi se izlaganje nastavilo i tokom eksperimenta. Po 1 mL suspenzije ćelija u puferu za adheziju je sađeno u ploče sa 12 bunarića ($0,4 \times 10^6$ ćelija po bunariću) koje su prethodno obložene želatinom i blokirane rastvorom 1% BSA u PBS po gore opisanom protokolu. Ploče su potom inkubirane na 37°C u trajanju od 30 min. Nakon isteka inkubacije, ćelije su tri puta pažljivo ispirane čistim medijumom, 1 mL po bunariću, i potom fotografisane na invertnom svetlosnom mikroskopu. Broj zalepljenih ćelija je zatim kvantifikovan

pomoću testa sa bojom SRB (opisano u poglavlju 3.7), a vezivanje ćelija za ECM je izraženo kao procenat EA.hy926 ćelija koje su se vezale za želatin u odnosu na kontrolu.

3.7. Određivanje broja ćelija testom sa bojom sulforodamin B

Test se zasniva na tome što određeni aminokiselinski ostaci ćelijskih proteina usvajaju negativno obojeni ljubičasti aminoksantin sulforodamin B (SRB). Veći broj ćelija usvaja veću količinu boje, pa samim tim spektrofotometrijski izmeren intenzitet boje (apsorbanca) ima veću vrednost. Test je rađen po prethodno opisanom protokolu (Pogrmić-Majkić i sar., 2014), uz određene izmene. U cilju određivanja broja ćelija u svakom bunariću, EA.hy926 ćelije su fiksirane 1 h na 4°C korišćenjem 50% TCA (pripremana u hladnoj dH₂O) u količini od 1/4 početne zapremine medijuma u bunariću, dakle po 0,25 mL u 35 mm posude ili po 25 µL u bunariće ploče sa 96 bunarića. Po završetku procesa fiksiranja, višak TCA je uklanjan ispiranjem pet puta dH₂O, 1 mL po posudi, odnosno 100 µL po bunariću, a zatim su ćelije bojene rastvorom 0,4% SRB (u 1% sirćetnoj kiselini) koji je dodavan u količini koja odgovara 1/2 početne zapremine medijuma. Posle dodavanja boje, ploče su inkubirane 30 min na sobnoj temperaturi nakon čega je uklanjan višak boje ispiranjem pet puta 1% sirćetnom kiselinom, 1 mL po posudi ili 0,1 mL po bunariću. Vezana boja je zatim rastvarana u 0,5 mL ili 50 µL 10 mM Tris baze (pH 10,5). Iz svake 35 mm posude je po 0,1 mL prebacivano u 4 bunarića ploče sa 96 bunarića, čime je dobijeno 4 ponovka iz svakog bunarića, odnosno od svake tretirane grupe ćelija. Apsorbance su merene na spektrofotometru Thermo Labsystems Multiscan EX na talasnoj dužini $\lambda_1=492$ nm i referentnoj talasnoj dužini $\lambda_2=690$ nm. Konačna vrednost signala je izračunata kao razlika prve i druge apsorbance ($A = A_{492} - A_{690}$).

3.8. Ispitivanje migracije ćelija

Uticaj dugotrajnog i kratkotrajnog izlaganja odabranim koncentracijama BPA i DBP na sposobnost migracije EA.hy926 ćelija ispitivan je pomoću dve metode. Test „zarastanja povrede“ (eng. *wound-healing assay*) je korišćen za potrebe ispitivanja uticaja dugotrajnog i kratkotrajnog izlaganja BPA, kao i kratkotrajnog izlaganja DBP na migraciju EA.hy926 ćelija, dok je za potrebe ispitivanja uticaja dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija DBP korišćen test migracije ćelija u Transwell sistemu.

3.8.1. Ispitivanje migracije ćelija testom „zarastanja povrede“

Metoda se zasniva na praćenju migracije ćelija u povredu (eng. *scratch*) koja se formira povlačenjem sterilnog nastavka kroz konfluentan sloj ćelija. Pre sađenja ćelija za eksperiment su sa donje strane ploče sa 12 bunarića markerom povučene dve horizontalne linije na osnovu kojih je definisana oblast u vidnom polju u okviru koje će se pratiti migracija ćelija.

Za potrebe ispitivanja uticaja dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA na migraciju, EA.hy926 ćelije su uzimane iz svakog flaska nakon pet, devet i četrnaest nedelja izlaganja BPA, a zatim sađene u ploču sa 12 bunarića, $0,6 \times 10^6$ ćelija u 1 mL kompletnog medijuma, po jedan bunarić od svakog flaska. Nakon lepljenja ćelija u trajanju od 3 h na 37°C, na postojeći medijum u odgovarajućim bunarićima je dodavano po 1 mL razblaženih radnih rastvora BPA ili apsolutnog etanola da bi se dobile odgovarajuće finalne koncentracije tretmana i kontrole. Nakon 24 h, medijum je uklanjan, a potom je formiran vertikalni presek povlačenjem sterilnog nastavka od 200 µL kroz središnji sloj ćelija. Ćelije koje su prilikom formiranja povrede odvojene od podloge su ispirane tri puta medijumom bez seruma, 1 mL po

bunariću, a zatim su ćelije sa novoformiranom povredom fotografisane pod invertnim svetlosnim mikroskopom (2 ili 4 fotografije po povredi). Nakon toga je medijum bez seruma uklanjan, a u bunariće je dodavano po 1 mL odgovarajućih tretmana i kontrole koji su pripremljeni u kompletnom medijumu. Ploče su zatim ostavljane u inkubator na 37°C. Fotografije su ponovo načinjene posle 10 h, nakon što su ćelije migrirale u povredu, koristeći horizontalne linije kao smernice u cilju fotografisanja istih mesta kao i na početku, pre nego što su ćelije migrirale u povredu. Kvantifikacija migracije (određivanje procenta „zarastanja povrede”) je urađena korišćenjem programa NIH Image J (<https://Image.J.nih.gov/>), na taj način što je na fotografijama mereno rastojanje između ivice ćelija sa obe strane povrede na početku (0 h) i nakon migracije u trajanju od 10 h. Za kvantifikaciju je korišćena srednja vrednost od 8-9 merenja po fotografiji. Za svaki tretman i kontrolu izračunata je srednja vrednost rastojanja između ivice ćelija sa obe strane povrede na početku i nakon što su ćelije migrirale, a potom je migracija izražena kao procenat EA.hy926 ćelija koje su migrirale u odnosu na kontrolu.

Za potrebe ispitivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na migraciju endotelnih ćelija, za svaki tretman i kontrolu je u ploču sa 12 bunarića sađeno po 1×10^6 ćelija u 1 mL kompletnog medijuma po bunariću, jedan bunarić za svaki tretman. Sledećeg dana su ćelije ispirane dva puta medijumom bez seruma, 1 mL po bunariću, a zatim su u bunariće dodavani odgovarajući tretmani i kontrole u medijumu bez seruma, 1 mL po bunariću. U pojedinim eksperimentima sa DBP, gde je to naznačeno, EA.hy926 ćelije su tokom 45 min pretretirane sa: ICI 182,780 (10 μ M), G-15 (5 μ M), U0126 (5 μ M), vortmaninom (1 μ M) i L-NAME (100 μ M), inhibitorom NOS. Nakon 24 h, medijum je uklanjan, a potom je formiran vertikalni presek kroz središnji sloj ćelija, prema protokolu opisanom u pasusu iznad. Ćelije koje su prilikom formiranja povrede odvojene od podloge su ispirane tri puta medijumom bez seruma, 1 mL po bunariću, a zatim su ćelije sa novoformiranom povredom fotografisane pod invertnim svetlosnim mikroskopom (2 ili 4 fotografije po povredi). Nakon toga je medijum bez seruma uklanjan, a u bunariće je dodavano po 1 mL odgovarajućih tretmana i kontrole koji su pripremljeni u medijumu bez seruma. Ploče su zatim ostavljane u inkubator na 37°C. Fotografije su ponovo načinjene posle 24 h, nakon što su ćelije migrirale u povredu, koristeći horizontalne linije kao smernice. Kvantifikacija migracije je urađena na način opisan u prethodnom pasusu.

3.8.2. Ispitivanje migracije ćelija u Transwell sistemu

Metoda za praćenje migracije ćelija kroz poroznu polikarbonatnu membranu gornjeg odeljka Transwell ploče u donji odeljak u kom se nalazi potencijalni stimulus (hemoatraktant) naziva se još i modifikovana Boyden Chamber tehnika.

Za potrebe ispitivanja uticaja dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP na migraciju, EA.hy926 ćelije su uzimane iz svakog flaska nakon tri, šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja DBP, a zatim sađene u gornje odeljke Transwell ploče sa 24 bunarića (veličina pora 8 μ m), $0,5 \times 10^5$ ćelija u 0,1 mL medijuma bez seruma, po jedan odeljak za svaki flask. U donje odeljke Transwell ploče je dodavano po 0,6 mL odgovarajućih tretmana ili kontrole u medijumu bez seruma. Transwell ploče su zatim inkubirane 5 h na 37°C. Nakon završene inkubacije, medijum je uklanjan iz oba odeljka, a odeljci su zatim ispirani dva puta rastvorom PBS, 0,5 mL po odeljku. Ćelije koje nisu migrirale kroz membranu su štapićem sa vatom fizički uklanjane sa gornje površine membrane. Potom su oba odeljka ponovo ispirana dva puta rastvorom PBS, 0,5 mL po odeljku, a zatim su ćelije fiksirane rastvorom 4% paraformaldehida (PFA), 0,5 mL po bunariću, 20 min na sobnoj temperaturi. Oba odeljka su potom ponovo ispirana dva puta rastvorom PBS, 0,5 mL po odeljku, da bi se uklonio višak PFA. Polikarbonatna membrana sa fiksiranim ćelijama je potom pažljivo isecana skalpelom i stavljena na predmetnu mikroskopsku pločicu tako da donja strana membrane bude okrenuta prema gore. Na membranu je zatim stavljano po 2 kapi rastvora za očuvanje fluorescencije VECTASHIELD® PLUS koji sadrži fluorescentnu

boju DAPI. Membrana je potom zaštićena pokrovnim staklom, a predmetno i pokrovno staklo su lepljeni po ivicama providnim lakom za nokte kako bi se sprečilo isparavanje rastvora VECTASHIELD® PLUS i isušivanje membrane. Ovako pripremane mikroskopske pločice su zatim ostavljane na 4°C, zaštićene od svetla, do pravljenja fotografija na fluorescentnom mikroskopu Zeiss Axio Imager.A2. Korišćenjem odgovarajućeg filtera na mikroskopu (DAPI) za svaku membranu je napravljeno 10–12 fotografija nasumično odabranih vidnih polja. Kvantifikacija migracije je urađena korišćenjem programa NIH Image J (<https://Image.J.nih.gov/>) na taj način što su na fotografijama sa fluorescentnog mikroskopa brojana jedra ćelija obojena fluorescentnom bojom DAPI. Za svaki tretman i kontrolu računata je srednja vrednost broja ćelija koje su migrirale kroz membranu, a potom je migracija izražavana kao procenat EA.hy926 ćelija koje su migrirale u odnosu na kontrolu.

3.9. Određivanje aktivnosti matriksnih metaloproteinaza pomoću želatinske zimografije

Zimografija predstavlja metodu za merenje aktivnosti proteolitičkih enzima i ima široku primenu u detekciji i kvantifikaciji aktivnosti različitih proteaza u tkivima i telesnim tečnostima, analizi specifičnosti enzima za supstrat, osetljivosti enzima na razne faktore i dr. (Leber i Balkwill, 1997; Kundapur, 2013). Klasična i najčešće primenjena zimografija je supstratna zimografija. Osnova ove tehnike je SDS-poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE). Razlika između zimografije i SDS-PAGE se ogleda u tome što se u zimografiji u sastav gela dodaje i određeni supstrat koji proteaza od interesa degradira tokom perioda inkubacije, čime se i određuje aktivnost datog enzima (d'Avila-Levy i sar., 2012). Supstratna elektroforeza je karakteristična po tome što se u razdvajajući gel osim klasičnih komponenti za SDS-PAGE takođe dodaje i supstrat poput želatina. Želatinska zimografija se koristi za detekciju aktivnih i latentnih formi enzima želatinaza, pre svega enzima MMP poput MMP-2 i MMP-9, dok se u manjoj meri mogu detektovati i neke druge forme MMP.

Zimografijom je merena enzimaska aktivnost MMP koje su EA.hy926 ćelije otpustile u medijum. Zimografija nije rađena u okviru ispitivanja uticaja dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na različite funkcijske odgovore ovih ćelija zbog toga što serum iz medijuma u kom su ćelije gajene tokom ovih eksperimenata sadrži proteaze koje mogu da daju lažno pozitivne rezultate. Iz tog razloga je zimografija rađena samo u eksperimentima u kojima su EA.hy926 ćelije kratkotrajno izlagane odabranim koncentracijama BPA i DBP u medijumu bez seruma.

Za potrebe ispitivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na aktivnost MMP, medijum je uziman iz ploča u kojima je praćena migracija EA.hy926 ćelija (opisano u potpoglavlju 3.8.1). Pri sađenju ćelija za ispitivanje uticaja kratkotrajnog izlaganja BPA na migraciju EA.hy926 ćelija sađen je jedan dodatni bunarić u kom su ćelije izlagane TNF- α u finalnoj koncentraciji od 10 ng/mL u trajanju od 24 h. Ovaj uzorak medijuma je predstavljao pozitivnu kontrolu. Sakupljeni medijumi su potom prečišćavani korišćenjem kolona za prečišćavanje MICROCON® Centrifugal Filter Devices (Amicon Bioseparations, MA, SAD) prema uputstvima proizvođača. U cilju pripreme prečišćenih uzoraka medijuma za elektroforezu, 2x koncentrovani pufer bez redukujućih agenasa je mešan sa uzorcima u odnosu 1:1, tako da su finalne koncentracije u svakom uzorku iznosile: 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol i 0,01% bromofenol-plavo. Ovako pripremani uzorci su zatim korišćeni za nativnu elektroforezu na poliakrilamidnom gelu koji je kopolimerizovan sa želatinom u finalnoj koncentraciji od 1 mg/mL.

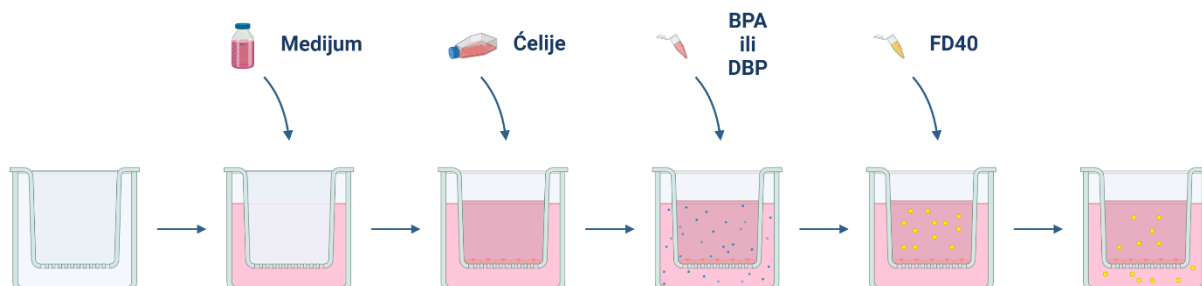
Radni rastvor želatina je pripreman na taj način što je želatin poreklom iz svinjske kože rastvaran u dH₂O na 65°C, uz konstantno mešanje, tako da je finalna koncentracija iznosila 2,65

mg/mL. Gel za elektroforezu se sastojao od dela za koncentrovanje uzoraka (3% gel: 4,575 mL dH₂O, 1,875 mL 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 75 µL 10% SDS, 0,9975 mL 30% akrilamid/bis-akrilamida, 37,5 µL 10% amonijum-persulfata, 7,5 µL TEMED) i dela za razdvajanje uzoraka (10% gel kopolimerizovan sa želatinsom: 4,15 mL radnog rastvora želatins, 2,625 mL 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 82,5 µL 50% glicerola, 82,5 µL 10% SDS, 3,5 mL 30% akrilamid/bis-akrilamida, 50 µL 10% amonijum persulfata, 5 µL TEMED).

Jednake zapremine uzoraka (35–50 µL) su nalivane u bunariće ovako napravljenog poliakrilamidnog gela, kao i proteinski marker u zasebni bunarić. Proteini iz uzoraka su razdvajani u strujnom kolu pri konstantnom naponu od 100 V u Mini-PROTEAN Tetra Cell aparatu za elektroforezu (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, SAD) na 4°C tokom 120-140 min. Nakon elektroforeze, gel je prvo ispiran 1 h u rastvoru za ispiranje (2,5% Triton X-100, 50 mM Tris, pH 7,4, 5 mM CaCl₂ i 1 µM ZnCl₂), uz konstantno mešanje i zamenu rastvora na svakih 20 min. Nakon ispiranja, gel je kratko ispiran dH₂O, a zatim inkubiran u puferu za inkubaciju (50 mM Tris, pH 7,4, 5 mM CaCl₂, 1 µM ZnCl₂ i 0,01% natrijum-azid) na 37°C tokom 40 h. Po isteku inkubacije, gel je bojen u rastvoru za bojenje (0,5% CBB G250 u 30% etanolu i 10% sirćetnoj kiselini) u trajanju od 30 min na sobnoj temperaturi uz konstantno mešanje. Gel je zatim obezbojavan pomoću rastvora za obezbojavanje (30% etanol i 10% sirćetna kiselina) uz čestu zamenu rastvora i konstantno mešanje sve dok se nisu pojavile obezbojene trake na tamnoj pozadini gela. U tom trenutku je obezbojavanje zaustavljano dodavanjem rastvora 2% sirćetne kiseline. U datom rastvoru je gel ostavljan preko noći na 4°C radi rehidratacije. Gel je potom fotografisan pomoću aparata myECL Digital Imaging System (Thermo Scientific), a intenzitet prosvetljenih traka na gelu koji odgovara intenzitetu enzimske aktivnosti u uzorcima je kvantifikovan pomoću programa NIH Image J (<https://ImageJ.nih.gov/>).

3.10. Ispitivanje propustljivosti jednosloja endotelnih ćelija u Transwell sistemu

Uticaj dugotrajnog i kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na integritet i propustljivost konfluentnog jednosloja ovih ćelija ispitivan je pomoću Transwell sistema. Metoda se sastoji u ispitivanju prolaska fluorescentnog molekula FITC-dekstrana velike molekulske mase (FD40; Mw 40 kDa) kroz međućelijski prostor konfluentnog jednosloja endotelnih ćelija i kroz poroznu polikarbonatnu membranu gornjeg odeljka Transwell ploče u donji odeljak (slika 3.3). Na osnovu intenziteta fluorescencije u donjem odeljku se zatim procenjuje uticaj tretmana na integritet endotelne barijere.



Slika 3.3. Šematski prikaz eksperimentalnog pristupa u ispitivanju propustljivosti jednosloja endotelnih ćelija u Transwell sistemu nakon dugotrajnog i kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama bisfenola A i dibutil-ftalata. Slika je kreirana u programu BioRender (<https://www.biorender.com>).

Za potrebe ispitivanja uticaja dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na propustljivost konfluentnog jednosloja endotelnih ćelija, EA.hy926

ćelije su uzimane iz svakog flaska nakon pet i četrnaest nedelja izlaganja BPA, odnosno tri, šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja DBP, a zatim sađene na površinu polikarbonatne membrane gornjeg odeljka Transwell ploče sa 24 bunarića (veličina pora 0,4 μm), $0,1 \times 10^6$ ćelija u 0,4 mL kompletnog medijuma, po dva bunarića za svaki flask. Polikarbonatne membrane su pre sađenja ćelija oblagane fibronektinom na taj način što je po 200 μL rastvora 5% fibronektina u DMEM dodavano na gornju površinu polikarbonatne membrane. Ploče su zatim ostavljane 45 min na sobnoj temperaturi nakon čega je fibronektin uklanjan i ćelije su posađene na prethodno opisan način. Nakon lepljenja ćelija u trajanju od 3 h na 37°C, medijum je pažljivo uklanjan, a zatim je u gornji i donji odeljak Transwell ploče dodavano po 0,5 mL odgovarajućih tretmana i kontrole. Ćelije su gajene narednih pet do šest dana, uz zamenu medijuma sa odgovarajućim tretmanima na svaka dva do tri dana, sve dok nije uspostavljen kontinuirani sloj gusto zbijenih ćelija, nalik na endotel *in vivo*. Potom su Transwell ploče ispirane dva puta sa po 0,5 mL rastvora HBSS u oba odeljka. Iz gornjih odeljaka je uklanjan HBSS, zatim je u svaki odeljak dodavano po 0,3 mL HBSS, a nakon toga 0,1 mL rastvora HBSS sa FD40 koncentracije 4 mg/mL tako da je nakon razblaženja finalna koncentracija FD40 iznosila 1 mg/mL. Transwell ploče su ostavljane u inkubator, a zatim je nakon 15 min prebacivano po 100 μL medijuma iz donjih odeljaka Transwell ploče u zasebne bunariće crne ploče sa 96 bunarića u kojoj je potom meren intenzitet fluorescencentnog signala. Fluorescencija je merena na fluorimetru Thermo Labsystems Fluoroskan Ascent sa prethodno podešenim talasnim dužinama: talasna dužina ekscitacije $\lambda_{\text{ex}}=485$ nm i talasna dužina emisije $\lambda_{\text{em}}=538$ nm.

Za potrebe ispitivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na propustljivost konfluentnog jednosloja endotelnih ćelija, EA.hy926 ćelije su sađene na površinu polikarbonatne membrane gornjeg odeljka Transwell ploče sa 24 bunarića (veličina pora 0,4 μm), $0,1 \times 10^6$ ćelija u 0,6 mL kompletnog medijuma, po dva bunarića za svaki tretman. Polikarbonatne membrane su pre sađenja ćelija oblagane fibronektinom na način opisan u prethodnom pasusu. Ćelije su gajene narednih pet do šest dana u kompletnom medijumu, uz zamenu medijuma na svaka dva do tri dana, sve dok nije uspostavljen kontinuirani sloj ćelija koji predstavlja gustu selektivno propustljivu barijeru. Ćelije u Transwell ploči su potom izlagane odgovarajućem rastvaraču i trima koncentracijama ispitivane supstance (BPA ili DBP) na taj način što je u gornji i donji odeljak Transwell ploče dodavano po 0,6 mL odgovarajućih tretmana ili kontrole. Ćelije su izlagane BPA i DBP u trajanju od 48 h i 24 h, redom. Potom su Transwell ploče ispirane dva puta sa po 0,5 mL rastvora HBSS u oba odeljka. Dalji postupak je tekao po protokolu opisanom u prethodnom pasusu.

3.11. Određivanje nivoa reaktivnih vrsta kiseonika pomoću reagensa H₂DCFDA

Nivo ROS je određivan pomoću reagensa H₂DCFDA koji je podložan oksidaciji. H₂DCFDA je dobar indikator ROS zato što reaguje sa H₂O₂, •OH, ONOO⁻, lipidnim peroksidima, NO i u manjoj meri sa O₂•⁻. Esteraze unutar ćelija isecaju H₂DCFDA do 2',7'-dihlorodihidrofluoresceina (DCFH), čime se redukuje permeabilnost ovog reagensa kroz ćelijsku membranu. DCFH unutar ćelije reaguje sa ROS, pri čemu nastaje visoko fluorescentna boja 2'-7'-dihlorofluorescein (DCF) sa talasnom dužinom ekscitacije od $\lambda_{\text{ex}}=488$ nm i talasnom dužinom emisije od $\lambda_{\text{em}}=525$ nm.

Za potrebe ispitivanja uticaja dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na stvaranje ROS, EA.hy926 ćelije su uzimane iz svakog flaska nakon pet, devet, i četrnaest nedelja izlaganja BPA, odnosno tri, šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja DBP, a zatim sađene u ploču sa 96 bunarića, 4×10^4 ćelija u 150 μL kompletnog medijuma u osam bunarića: dva bunarića su služila za slepu probu, šest za dodavanje rastvora H₂DCFDA. Nakon lepljenja ćelija u trajanju od 3 h na 37°C, na postojeći medijum u odgovarajućim bunarićima je dodavano po 50 μL razblaženih radnih rastvora BPA, odnosno DBP i odgovarajuće kontrole kako

bi se postigle odgovarajuće finalne koncentracije tretmana. Posle 48 h, medijum iz bunarića je uklanjan multikanalnom pipetom, nakon čega su ploče ispirane dva puta rastvorom HBSS, 200 μL po bunariću. Ploče su zatim vraćane u inkubator na 15–20 min, a za to vreme je pripreman rastvor 50 μM H₂DCFDA u HBSS. U bunariće za slepu probu je zatim dodavano po 100 μL HBSS, dok je u preostale bunariće dodavano po 100 μL rastvora H₂DCFDA. Ploče su zatim inkubirane 30 min u mraku na 37°C. Nakon isteka inkubacije, ćelije su ispirane dva puta rastvorom HBSS, 100 μL po bunariću, a na kraju je u svaki bunarić dodavano po 100 μL 10 mM HEPES, pH 7,4. Fluorescencija je merena na fluorimetru Thermo LabSystems Fluoroskan Ascent sa prethodno podešenim talasnim dužinama: talasna dužina ekscitacije $\lambda_{\text{ex}}=485$ nm i talasna dužina emisije $\lambda_{\text{em}}=538$ nm. Kvantifikacija dobijenih rezultata urađena je na taj način što je signal poreklom od samih ćelija (bez H₂DCFDA, blank) prvo oduziman od vrednosti dobijenih u svim bunarićima sa H₂DCFDA, a zatim su dobijene vrednosti normalizovane na broj ćelija u bunarićima. Broj ćelija u uzorcima je određivan testom sa bojom SRB, prema protokolu koji je opisan u poglavlju 3.7. Produkcija ROS je izražena kao procenat nivoa ROS u odnosu na kontrolu.

Za potrebe ispitivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na stvaranje ROS, EA.hy926 ćelije su sađene u dve ploče sa 96 bunarića: jedna ploča za tretman od 30 min, druga ploča za tretman od 24 h. Za svaki tretman i kontrolu je u ploču sa 96 bunarića sađeno po 5×10^4 ćelija u 150 μL kompletnog medijuma u dvanaest bunarića: četiri bunarića su služila za slepu probu, osam za dodavanje rastvora H₂DCFDA. Nakon 24 h, medijum iz bunarića je uklanjan multikanalnom pipetom nakon čega su ploče ispirane dva puta medijumom bez seruma, 200 μL po bunariću. Nakon ispiranja, u svaki bunarić obe ploče je dodavano po 150 μL medijuma bez seruma i ploče su ostavljane u inkubator na 37°C. Nakon 4 h, u ploču za tretmane od 24 h je na postojećih 150 μL medijuma bez seruma u bunariću dodavano 50 μL razblaženih radnih rastvora BPA, odnosno DBP i odgovarajuće kontrole u medijumu bez seruma kako bi se postigle odgovarajuće finalne koncentracije tretmana. Nakon 24 h, iz obe ploče je multikanalnom pipetom uklanjan medijum, a zatim su ćelije ispirane dva puta rastvorom HBSS, 100 μL po bunariću. Ploče su zatim vraćane u inkubator na 15-20 min, a za to vreme je pripreman rastvor 50 μM H₂DCFDA u HBSS. U bunariće za slepu probu je zatim dodavano po 80 μL HBSS, dok je u preostale bunariće dodavano po 80 μL rastvora H₂DCFDA. Ploče su zatim inkubirane 30 min u mraku na 37°C. Nakon isteka inkubacije je na postojećih 80 μL u svakom bunariću obe ploče dodavano 20 μL razblaženih radnih rastvora BPA, odnosno DBP i odgovarajuće kontrole u HBSS. Ploče su zatim inkubirane 30 min u mraku na 37°C. Nakon isteka inkubacije, ćelije su ispirane dva puta rastvorom HBSS, 100 μL po bunariću, a na kraju je u svaki bunarić dodavano po 100 μL 10 mM HEPES, pH 7,4. Fluorescencija je merena i broj ćelija je određivan testom sa bojom SRB kako je opisano u prethodnom pasusu.

3.12. Određivanje koncentracije nitrita metodom po Griess-u

Uticaj dugotrajnog i kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na stvaranje NO ispitivan je posredno merenjem koncentracije nitrita, stabilnog proizvoda oksidacije NO. Nivo akumuliranih nitrita u medijumu je određivan metodom po Griess-u (eng. *Griess test*) koja se zasniva na reakcijama nitrita sa sulfanilnom kiselinom (SA) i N-(1-naftil)etilendiaminom (NED), nakon kojih nastaje obojeni proizvod čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji nitrita u ispitivanim uzorcima.

Za potrebe ispitivanja uticaja dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA na nivo nitrita, po 1 mL medijuma je uzimano direktno iz svakog flaska nakon pet, devet i četrnaest nedelja izlaganja ćelija BPA i prenošeno u ohlađene tubice na ledu. Ovako sakupljeni uzorci su dalje pripremani za merenje nitrita. Pored toga, u četrnaestoj nedelji izlaganja su ćelije uzimane iz kontrolnih flaskova i flaskova koji su bili dugotrajno izlagani 10^{-7} M BPA, a zatim sađene u ploče sa 12 bunarića, $0,1 \times 10^6$ ćelija u 0,5 mL kompletnog medijuma po

bunariću, po jedan bunarić za svaki flask. Nakon lepljenja ćelija u trajanju od 3 h na 37°C na postojeći medijum u odgovarajućim bunarićima je dodavano po 0,5 mL razblaženih radnih rastvora BPA ili apsolutnog etanola kako bi se postigle finalne koncentracije tretmana ili kontrole. Narednog dana je u odgovarajuće bunariće dodavan inhibitor L-NAME u finalnoj koncentraciji od 100 µM. Nakon tri dana određivana je koncentracija akumuliranih nitrita u medijumu. Za potrebe ispitivanja uticaja dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP na nivo nitrita, EA.hy926 ćelije su uzimane iz svakog flaska nakon tri, šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja DBP, a zatim sađene u ploče sa 24 bunarića, $1,5 \times 10^5$ ćelija u 0,5 mL po bunariću, po jedan bunarić za svaki flask. Nakon lepljenja ćelija u trajanju od 3 h na 37°C na postojeći medijum u odgovarajućim bunarićima je dodavano po 0,1 mL razblaženih radnih rastvora DBP ili DMSO kako bi se postigle finalne koncentracije tretmana ili kontrole. Izlaganje ćelija je nastavljeno tokom 48 h, nakon čega je po 0,4 mL medijuma iz svakog bunarića sakupljano u ohlađene tubice na ledu.

Tubice sa sakupljenim medijumima su potom centrifugirane 5 min na 1.000 xg, na 4°C. Za pravljenje standardne krive, na osnovu koje će se određivati nepoznata koncentracija NO_2^- u uzorcima, pripremani su standardni rastvori NaNO_2 raspona koncentracija od 0,2375 do 15,625 µM u kompletnom medijumu sa odgovarajućim rastvaračem: 0,1% apsolutni etanol za merenje nivoa nitrita nakon dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija BPA, odnosno 0,05% DMSO za merenje nivoa nitrita nakon izlaganja ćelija DBP. U ploču sa 96 bunarića je zatim u tri ponavljanja dodavano po 100 µL standardnih rastvora NaNO_2 , uzoraka sa nepoznatom koncentracijom nitrita i slepe probe (kompletan medijum sa 0,1% apsolutnim etanolom za uzorke koji su izlagani BPA, odnosno sa 0,05% DMSO za uzorke koji su izlagani DBP). Potom je u sve bunariće dodavano po 100 µL Griess-ovog reagensa (5% orto-fosforna kiselina, 0,1% NED, 1% SA u dH_2O). Ploča je potom inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi zaštićena od svetla. Po isteku inkubacije, apsorbance su merene na spektrofotometru Thermo Labsystems Multiscan EX na talasnoj dužini $\lambda=540$ nm. Na osnovu vrednosti apsorbanci uzoraka i parametara standardne krive, računata je koncentracija nitrita za svaki uzorak, a dobijene vrednosti su zatim normalizovane na koncentraciju proteina u uzorcima. Koncentracija proteina je određivana tako što su ćelije koje su ostale u bunarićima lizirane puferom za liziranje, a potom je koncentracija proteina u lizatima određivana prema protokolu koji je opisan u poglavlju 3.13. Koncentracije nitrita u uzorcima su izražene u µM nitrita po g proteina ili relativno, kao procenat nivoa nitrita u odnosu na kontrolu.

Za potrebe ispitivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na stvaranje nitrita, EA.hy926 ćelije su sađene u ploče sa 12 bunarića, $0,4 \times 10^6$ ćelija u 1 mL kompletnog medijuma po bunariću, jedan bunarić za svaki tretman. U eksperimentima sa BPA ćelije su izlagane 1 h i 48 h, dok su u eksperimentima sa DBP izlagane 24 h i 48 h. Za potrebe izlaganja ćelija BPA u trajanju od 1 h, bunarići su narednog dana ispirani dva puta rastvorom PBS, 1 mL po bunariću, nakon čega je u bunariće dodavano 0,6 mL medijuma bez seruma. Sledećeg dana je na već postojeći medijum u bunarićima dodavano po 0,6 mL razblaženih radnih rastvora BPA i odgovarajuće kontrole u medijumu bez seruma. Za potrebe izlaganja ćelija u trajanju od 24 ili 48 h, u danu nakon sađenja ćelija je uklanjan postojeći medijum iz svih bunarića u pločama, a zatim je u odgovarajuće bunariće dodavano po 1,5 mL razblaženih radnih rastvora BPA i odgovarajuće kontrole ili 1 mL razblaženih radnih rastvora DBP i odgovarajuće kontrole. U pojedinim eksperimentima, gde je to naznačeno, EA.hy926 ćelije su tokom 45 min pretretirane sa: ICI 182,780 (10 µM), G-15 (10 µM) i vortmaninom (1 µM). Nakon isteka tretmana je po 1 mL medijuma iz svakog bunarića prebacivano u ohlađene tubice na ledu koje su potom centrifugirane 5 min na 1.000 xg, na 4°C. Dalji koraci, uključujući dodavanje medijuma u ploču, pravljenje standardne krive i dodavanje Griess-ovog reagensa, odvijali su se prema protokolu opisanom u prethodnom pasusu.

3.13. Određivanje koncentracije proteina metodom Pierce BCA

Koncentracija proteina u uzorcima je određivana spektrofotometrijski korišćenjem komercijalnog kompleta za određivanje proteina Pierce BCA Protein Assay Kit, prema uputstvima proizvođača. Metoda se bazira na reakciji koja ima dva koraka. Prvi korak predstavlja biuretsku reakciju, redukciju Cu^{2+} do Cu^+ , odnosno helaciju bakra koju vrše proteini u alkalnoj sredini pri čemu nastaje kompleks svetlo plave boje. U drugom koraku bicinhoninska kiselina (eng. *bicinchoninic acid*, BCA) reaguje sa redukovanim katjonom bakra što daje rastvoru intenzivnu ljubičastu boju čiji se intenzitet zatim očitava kolorimetrijski (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225>).

Ćelije u bunarićima su nakon uzimanja medijuma za određivanje nitrita ispirane dva puta hladnim rastvorom PBS, 1–2 mL po bunariću. Nakon toga je u svaki bunarić dodavano po 60–100 μL pufera za liziranje koji se sastoji od RIPA pufera (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0,5% natrijum-deoksiholat, 0,1% SDS, pH 7,4) i koktela inhibitora proteaza. Posle liziranja ćelija u trajanju od 40 min u frižideru, ćelijski lizat je sakupljan u ohlađene tubice na ledu i centrifugiran 10 min na 12.000 xg, na 4°C. Po isteku centrifugiranja, u ploču sa 96 bunarića je u duplikatu pipetirano po 10 μL standardnih rastvora proteina (raspona koncentracija 25–2.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i uzoraka koji su mešani sa puferom za liziranje RIPA u odnosu 1:1 (5 μL uzoraka i 5 μL pufera za liziranje RIPA), čime je postignuto dvostruko razblaženje uzoraka. Nakon toga je u sve bunariće dodavano po 200 μL reagensa BCA koji je pripreman mešanjem reagenasa A i B u odnosu 50:1. Nakon inkubacije u trajanju od 30 min na 37°C merene su apsorbance na spektrofotometru Thermo Labsystems Multiscan EX na talasnoj dužini $\lambda=540$ nm, a potom je na osnovu dobijenih vrednosti apsorbanci uzoraka, parametara standardne krive i razblaženja uzoraka računata koncentracija proteina u svakom uzorku. Koncentracija proteina u uzorcima je izražena u mg/mL.

3.14. Određivanje angiogeneze u uslovima *in vitro*

Uticaj dugotrajnog i kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija DBP na angiogenezu u uslovima *in vitro* je ispitivan testom formiranja endotelne tuba (Arnaoutova i Kleinman, 2010). Test se zasniva na praćenju formiranja cevastih struktura poreklom od endotelne ćelije u gelastom trodimenzionalnom matriksu, koji po svom sastavu predstavlja rekonstituisanu bazalnu membranu bez prisustva faktora rasta. Ovaj sistem omogućava određivanje angiogenog potencijala različitih egzogenih supstanci u uslovima *in vitro* (Arnaoutova i sar., 2009).

Za potrebe ispitivanja uticaja dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP na angiogenezu u uslovima *in vitro*, na ledu je odmrzavan jedan alikvot Cultrex ekstrakta dovoljan za 16 uzoraka. Cultrex je na temperaturama ispod 0°C u čvrstom stanju (zamrznut), na 0°C je u tečnom stanju, dok na 37°C prelazi u formu gela. Tokom rada su tubice, kutije sa nastavcima i ploča sa 96 bunarića držani sve vreme na ledu, kako bi Cultrex bio tečan i pogodan za nanošenje u ploče. Dodavano je po 50 μL Cultrex ekstrakta po bunariću u 16 bunarića ploče sa 96 bunarića, vodeći računa da se ne formiraju mehurići vazduha. U okolne bunariće je dodavano po 200 μL PBS. Ploča je stavljana u inkubator na 37°C u trajanju od najmanje 45 min. Za to vreme je tečni Cultrex očvrstnuo u gel. Dok je ploča bila u inkubatoru, pripremane su ćelije sa tretmanima. EA.hy926 ćelije su uzimane iz svakog flaska nakon tri, šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja DBP. Tubice sa suspenzijom ćelija ($0,1 \times 10^6$ ćelija) su centrifugirane 5 min na 400 xg, na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja pažljivo je uklanjan supernatant, a zatim je u tubice dodavano po 0,5 mL rastvora PBS kako bi se ćelije isprale i kako bi se uklonili tragovi seruma iz medijuma u kom su ćelije gajene. Tubice su zatim ponovo centrifugirane 5 min na 400 xg, na sobnoj temperaturi. Supernatant je potom ponovo pažljivo uklanjan, a talog ćelija je resuspendovan u 330 μL medijuma bez seruma. Za svaki uzorak je prebacivano po $0,3 \times 10^5$ ćelija u 100 μL medijuma bez seruma u tubice od 1,5 mL, u koje je zatim dodavano po 100 μL odgovarajućih

tretmana napravljenih tako da finalno razblaženje kontrole i tretmana bude 2.000 puta. Potom je po 100 μL suspenzije ćelija ($0,15 \times 10^5$ ćelija) sa odgovarajućim tretmanima dodavano u bunariće ploče sa 96 bunarića u kojima se nalazilo 50 μL Cultrex gela. Ćelije su ostavljane u inkubator na 37°C , a potom posmatrane pod invertnim svetlosnim mikroskopom sa faznim kontrastom i fotografisane nakon 8 h (4–5 fotografija po bunariću). Morfometrijska analiza je urađena pomoću alata Angiogenesis Analyzer u okviru programa NIH Image J (Carpentier i sar., 2020). Angiogenesis Analyzer za svaku obrađenu fotografiju daje dvadeset različitih parametara angiogeneze, od kojih je za statističku analizu odabrano šest najrelevantnijih: ukupna dužina tuba, broj čvorova, broj ukrštanja, broj segmenata, ukupna dužina segmenata i ukupna dužina račvanja. Svi rezultati su predstavljeni u odnosu na kontrolu koja je prikazana kao 100%.

Za potrebe ispitivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP na angiogenezu u uslovima *in vitro*, EA.hy926 ćelije su sadene u 35 mm posude ($1,5 \times 10^6$ ćelija u 2 mL kompletnog medijuma po posudi, jedna posuda za svaki tretman). Sledećeg dana je medijum iz posuda uklanjan i dodavano je po 2,5 mL odgovarajućih tretmana. U pojedinim eksperimentima, gde je to naznačeno, EA.hy926 ćelije su tokom 45 min pretretirane inhibitorima sa sledećim finalnim koncentracijama: U0126 (10 μM), vortmanin (1 μM) i L-NAME (100 μM). Nakon 24 h, Cultrex ekstrakt je pripreman i dodavan u ploče sa 96 bunarića kako je opisano u prethodnom pasusu. Dodavano je po 50 μL Cultrex ekstrakta po bunariću u 4 bunarića. Dok je ploča sa Cultrex ekstraktom bila u inkubatoru, pripremane su ćelije. Ćelije su ispirane dva puta rastvorom PBS, 2 mL po bunariću, a zatim je dodavano 0,5 mL tripsina po 35 mm posudi. Posude su zatim inkubirane 3 min na 37°C . Nakon isteka inkubacije, u svaku posudu je dodavano po 1,5 mL kompletnog medijuma, sadržaj je promešan provlačenjem više puta kroz pipetu, a zatim je dobijena suspenzija prebačena u tubice i potom centrifugirana 5 min na 400 xg, na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja, pažljivo je uklanjan supernatant, talog ćelija je resuspendovan u 3 mL rastvora PBS i ponovo centrifugiran 5 min na 400 xg, na sobnoj temperaturi. Supernatant je potom ponovo pažljivo uklanjan, a talog ćelija je resuspendovan u 1 mL medijuma bez seruma. Ćelije su potom brojane i $0,3 \times 10^6$ ćelija u 1 mL medijuma bez seruma je odvajano u poseban set tubica. U odgovarajuće suspenzije ćelija je dodavano po 1 mL odgovarajućih tretmana u medijumu bez seruma napravljenih tako da finalno razblaženje kontrole i tretmana bude 2.000 puta. Potom je po 100 μL suspenzije ćelija ($0,15 \times 10^5$ ćelija) sa odgovarajućim tretmanima dodavano u bunariće ploče sa 96 bunarića u kojima se nalazilo 50 μL Cultrex gela. Ćelije su ostavljane u inkubator na 37°C , a potom posmatrane pod invertnim svetlosnim mikroskopom sa faznim kontrastom i fotografisane nakon 8 h (4–5 fotografija po bunariću). Morfometrijska analiza je urađena na način opisan u prethodnom pasusu.

3.15. Relativna kvantifikacija ekspresije gena metodom RT-qPCR

Uticaj dugotrajnog i kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na relativnu ekspresiju odabranih gena uključenih u različite funkcijske odgovore EA.hy926 ćelija proučavan je pomoću kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (eng. *real-time quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR).

3.15.1. Priprema uzoraka i izolacija ukupne RNK

Za potrebe ispitivanja uticaja dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na relativnu ekspresiju gena, po 1 mL ćelijske suspenzije ($\sim 0,75 \times 10^6$ – $0,9 \times 10^6$ ćelija) je uzimano iz svakog flaska nakon pet i četrnaest nedelja izlaganja BPA, odnosno tri, šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja DBP u tubice zapremine 1,5 mL (bez RNaza, DNaza i pirogena). Ćelije su zatim centrifugirane 5 min na 400 xg, na sobnoj temperaturi, nakon čega je

supernatant uklanjan. Talog ćelija je resuspendovan u 1 mL rastvora PBS u cilju ispiranja ćelija, a potom su dobijane suspenzije ćelija ponovo centrifugirane 5 min na 400 xg, na sobnoj temperaturi. Dobijeni talog u svakoj tubici je resuspendovan u 0,5 mL reagensa TRIzol (uzorci izlagani BPA) ili 0,5 mL reagensa NZYol (uzorci izlagani DBP). Uzorci su potom zamrzavani i čuvani na -80°C do izolacije RNK.

U četrnaestoj nedelji dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA, ćelije su tokom pasažiranja sađene u ploče sa 6 bunarića ($0,35 \times 10^6$ ćelija u 1 mL kompletnog medijuma, dva bunarića od svakog flaska). Nakon lepljenja ćelija u trajanju od 3 h na 37°C , dodavani su tretmani tako što je na već postojećih 1 mL medijuma u bunariću dodavano po 1 mL tretmana odgovarajuće koncentracije BPA u kompletnom medijumu. Nakon 48 h, medijum u bunarićima je menjan svežim kompletnim medijumom sa odgovarajućim koncentracijama tretmana, dok je u po jedan bunarić zasađen od svakog flaska dodavan TNF- α u finalnoj koncentraciji od 10 ng/mL. Nakon 24 h su bunarići ispirani rastvorom PBS, 3 mL po bunariću, a potom je u svaki bunarić dodavano po 0,5 mL reagensa TRIzol. Uzorci su potom zamrzavani i čuvani na -80°C do izolacije RNK.

Za potrebe ispitivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na relativnu ekspresiju gena, EA.hy926 ćelije su sađene u 35 mm posude, $0,5 \times 10^6$ ćelija u 2 mL kompletnog medijuma po posudi, jedna posuda za svaki tretman. Sledećeg dana je medijum iz posuda uklanjan i dodavano je po 1,5 mL, 2 mL ili 3 mL odgovarajućih tretmana u zavisnosti od dužine trajanja izlaganja. Ćelije su izlagane BPA u trajanju od 24 h i 48 h, a DBP u trajanju od 6 h, 24 h i 48 h. Po isteku inkubacije, ćelije su jednom ispirane rastvorom PBS, 2 mL po ploči, a zatim lizirane u 0,5 mL reagensa TRIzol (uzorci izlagani BPA) ili 0,5 mL reagensa NZYol (uzorci izlagani DBP). Uzorci su potom zamrzavani i čuvani na -80°C do izolacije RNK.

Na dan izolacije RNK, uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi 5 min, nakon čega je u svaki uzorak dodavano po 0,1 mL hloroforma. Sadržaj u tubicama je potom intenzivno mešan na vorteksu, inkubiran na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 min i potom centrifugiran na 16.000 xg 15 min na 4°C . Nakon razdvajanja sadržaja u tubicama na vodenu i organsku fazu, vodena faza je prebacivana u nove tubice u koje je dodavano po 0,5 mL izopropanola. Tubice su nekoliko puta okrenute u ruci, a zatim centrifugirane na 16.000 xg 10 min na 4°C da bi se istaložila RNK. Supernatant je pažljivo uklanjan, na talog je zatim dodavano 1 mL 75% etanola i sadržaj je centrifugiran na 7.500 xg 5 min na 4°C . Nakon što je supernatant odlivan, tubice su ostavljane da se osuše na vazduhu. Ukupna RNK je resuspendovana u 35 μL H₂O tretirane dietilpirokarbonatom (eng. *diethyl pyrocarbonate*, DEPC). Koncentracija RNK u uzorcima je merena na aparatu BioSpec-Nano (Shimadzu, Japan), pri čemu su dobijani podaci o koncentraciji RNK ($A_{260\text{ nm}}$, izraženo u ng/ μL), čistoći u odnosu na proteine ($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$), kao i u odnosu na organske materije ($A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$). Na osnovu dva navedena odnosa zaključeno je da se čistoća dobijene RNK kretala u optimalnom opsegu, između 1,7 i 2,0.

3.15.2. Reverzna transkripcija

S obzirom na to da RNK ne može da bude matrica u PCR reakciji, sintetisana je cDNK na osnovu lanca iRNK u reakciji reverzne transkripcije pomoću High Capacity cDNA Reverse Transcription kompleta, prema uputstvima proizvođača. Ukupna zapremina reakcione smeše je iznosila 20 μL , a smeša se sastojala od 10 μL RNK (2 μg) u H₂O tretiranoj DEPC, 2 μL 10 x RT pufera, 0,8 μL 100 mM dNTP, 2 μL 10 x RT nasumičnih početnica, 1 μL reverzne transkriptaze (50 U/ μL) i 4,2 μL H₂O tretirane DEPC. Reakcija je izvođena u aparatu Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler u tri koraka: zagrevanje smeše 10 min na 25°C , 120 min na 37°C i 5 s na 85°C .

3.15.3. Kvantitativna RT-PCR analiza

Prevedena cDNK je služila za određivanje relativne ekspresije odabranih gena metodom RT-qPCR sa Power SYBR Green PCR Master Mix kompletom. SYBR Green je boja koja se vezuje za dvolančanu DNK pri čemu nastaje fluorescentni signal koji je direktno proporcionalan količini DNK produkta nastalog tokom PCR reakcije. Ukupna zapremina reakcione smeše je iznosila 12,5 μ L. Smeša se sastojala od 2,5 μ L cDNK koja je razblažena u H₂O tretiranoj DEPC pre dodavanja u reakcionu smešu, po 0,65 μ L specifičnih uzvodnih (eng. *forward primer*, F) i nizvodnih (eng. *reverse primer*, R) početnica (tabela 3.1), 3,8 μ L H₂O tretirane DEPC i 5 μ L kompleta za PCR reakciju Power SYBR Green PCR Master Mix. Pored reakcije koja je sadržala uzorke cDNK je postavljena i kontrolna reakcija bez matrice u koju je umesto cDNK dodavana H₂O tretirana DEPC. Kao endogena kontrola korišćen je konstitutivni „housekeeping” gen gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (*GAPDH*). Na samom početku je utvrđeno da dugotrajno i kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP nije uticalo na nivo iRNK za *GAPDH*. Svi uzorci su analizirani u duplikatu pod sledećim uslovima: 2 min na 50°C, 10 min na 95°C i 40 ciklusa po 15 s na 95°C i 1 min na 60°C. Uzorci izlagani BPA su analizirani na aparatu MasterCycler RealPlex (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), dok su uzorci izlagani DBP analizirani na aparatu CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, SAD).

Tabela 3.1. Sekvence početnica korišćenih u RT-qPCR analizi.

Gen	Identifikacioni broj	Sekvence parova početnica
<i>ICAM1</i>	NM_000201	F: 5'-ATGTGCAAGAAGATAGCCAACCA-3' R: 5'-TGGCAGCGTAGGGTAAGGTTC-3'
<i>VCAM1</i>	NM_001078	F: 5'-GTTGAAGGATGCGGGAGTAT-3' R: 5'-GGATGCAAAATAGAGCACGA-3'
<i>SELE</i>	NM_000450	F: 5'-CTGGCCTGCTACCTACCTGT-3' R: 5'-AGCTACCAAGGGAATGTTGG-3'
<i>NOS3</i>	NM_000603	F: 5'-GACCCTCACCGCTACAACAT-3' R: 5'-CTGGCCTTCTGCTCATTTTC-3'
<i>MMP1</i>	NM_002421	F: 5'-CTGTTTCAGGGACAGAATGTGCT-3' R: 5'-TCGATATGCTTCACAGTTCTAGGG-3'
<i>MMP2</i>	NM_004530	F: 5'-TCACTCCTGAGATCTGCAAACAG-3' R: 5'-TCACAGTCCGCCAAATGAAC-3'
<i>MMP9</i>	NM_004994	F: 5'-ACGCACGACGTCTTCCAGTA-3' R: 5'-CCACCTGGTTCAACTCACTCC-3'
<i>KDR</i>	NM_002253	F: 5'-GTGATCGGAAATGACACTGGAG-3' R: 5'-CATGTTGGTCACTAACAGAAGCA-3'
<i>CDH5</i>	NM_001795	F: 5'-TCACCTGGTCGCCAATCC-3' R: 5'-AGGCCACATCTTGGGTTTCC-3'
<i>VEGFA</i>	NM_001025366	F: 5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3' R: 5'-CACACAGGATGGCTTGAAGA-3'
<i>CXCL8</i>	NM_000584	F: 5'-AGTCCTTGTCCACTGTGCC-3' R: 5'-AGTGCTTCCACATGTCCTCAC-3'
<i>CCL2</i>	NM_002982	F: 5'-GCTCATAGCAGCCACCTTCATT-3' R: 5'-GATCACAGCTTCTTTGGGACACTT-3'
<i>GAPDH</i>	NM_002046	F: 5'-CAAGGCTGTGGCAAGGT-3' R: 5'-GGAAGGCCATGCCAGTGA-3'

Po završetku analize, dobijeni su podaci o amplifikaciji ispitivanih gena u funkciji broja ciklusa koji su zatim obrađivani pomoću metode poređenja praga ciklusa, $\Delta\Delta C_t$ (Livak i Schmittgen, 2001). Metoda omogućava normalizovanje ekspresije ciljnih gena sa endogenom kontrolom, kako za kontrolu, tako i za tretirane uzorke:

$$\Delta C_t = C_{t \text{ ciljni gen}} - C_{t \text{ GAPDH}}$$

U sledećem koraku je urađeno normalizovanje tretiranog sa kontrolnim uzorkom:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ tretman}} - \Delta C_{t \text{ kontrola}}$$

Koeficijent relativne ekspresije (R) ciljnog gena je računat na osnovu sledeće jednačine:

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Shodno gore navedenom, relativna ekspresija ispitivanih gena u svim uzorcima iskazivana je kao $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

3.16. Kvantifikacija ekspresije i fosforilacije proteina metodom Western blot

U cilju ispitivanja uticaja dugotrajnog i kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na ekspresiju i fosforilaciju (aktivaciju) proteina u EA.hy926 ćelijama, korišćena je metoda Western blot koja se zasniva na razdvajanju proteina iz uzorka po molekulskoj masi. Ova metoda omogućava detekciju proteina i kvantifikaciju ekspresije ciljanih proteina, kao i kvantifikaciju fosforilacije analiziranih proteina.

3.16.1. Priprema uzoraka za elektroforezu

Za potrebe ispitivanja uticaja dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP na ekspresiju proteina, uzimano je po 1×10^6 ćelija iz svakog flaska nakon pet i četrnaest nedelja izlaganja BPA, odnosno po $0,5 \times 10^6$ ćelija nakon tri, šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja DBP. Ćelije su sakupljane u ohlađene tubice zapremine 1,5 mL, a zatim centrifugirane 5 min na 400 xg, na 4°C, nakon čega je supernatant uklanjan. Talog ćelija je resuspendovan u 1 mL hladnog PBS u cilju ispiranja ćelija, a zatim je dobijena suspenzija ćelija centrifugirana 5 min na 400 xg, na 4°C. Nakon centrifugiranja, supernatant je pažljivo uklanjan, a dobijeni talog ćelija u svakoj tubici je ponovo resuspendovan u 1 mL hladnog PBS. Tubice su zatim ponovo centrifugirane 5 min na 400 xg, na 4°C, nakon čega je dobijeni talog ćelija u svakoj tubici liziran 40 min na 4°C u 100 µL hladnog pufera za liziranje RIPA koji je sadržao inhibitore proteaza.

Za potrebe ispitivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP na ekspresiju i aktivaciju proteina od interesa, EA.hy926 ćelije su sađene u ploče sa 12 bunarića, po $0,4 \times 10^6$ ćelija u 1 mL kompletnog medijuma po bunariću, jedan bunarić za svaki tretman. Sledećeg dana je medijum iz ploča uklanjan i dodavano je po 1 mL odgovarajućih tretmana DBP. Ćelije su izlagane DBP u trajanju od 24 h. U cilju određivanja fosforilacije proteina sađeno je po $0,4 \times 10^6$ ćelija u 0,8 mL kompletnog medijuma po bunariću, jedan bunarić za svaki tretman. Sledećeg dana je medijum uklanjan, bunarići su ispirani dva puta rastvorom PBS, 1 mL po bunariću, a zatim je u cilju „izgladnjivanja” ćelija (eng. *starvation*) u svaki bunarić dodavano po 0,6 mL medijuma bez seruma. Narednog dana je na već postojeći medijum u bunarićima dodavano po 0,6 mL odgovarajućih tretmana BPA ili DBP u medijumu bez seruma. Ćelije su izlagane BPA u trajanju od 60 min ili DBP u trajanju od 15 min do 120 min. U pojedinim eksperimentima sa kratkotrajnim izlaganjem ćelija DBP, gde je to naznačeno, EA.hy926 ćelije su tokom 45 min pretretirane sa: ICI 182,780 (5 µM) i G-15 (5 µM). Po isteku inkubacije, ćelije su dva puta ispirane hladnim rastvorom PBS, 2–3 mL po ploči, a zatim lizirane 40 min na 4°C u 100–200 µL hladnog

pufera za liziranje RIPA koji je sadržao inhibitore proteaza, kao i inhibitore fosfataza (1 mM natrijum-fluorid i 1 mM natrijum-ortovanadat) kada je analizirana fosforilacija proteina.

Ćelijski lizati dobijeni na gore opisani način kako iz dugotrajnog, tako i kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA i DBP su prenošeni u tubice od 1,5 mL na ledu, a zatim centrifugirani 10 min na 12.000 xg na 4°C, čime su istaloženi ostaci ćelija, a supernatant sa proteinima je prenošen u nove tubice na ledu. Koncentracija proteina u uzorcima je određivana spektrofotometrijski, na osnovu standardne krive, korišćenjem komercijalnog kompleta za određivanje proteina Pierce BCA Protein Assay Kit, prema protokolu opisanom u poglavlju 3.13. U cilju pripreme uzoraka za elektroforezu je 5x koncentrovani pufer sa redukujućim agensima mešan u odnosu 1:4 sa uzorcima, tako da su finalne koncentracije u svakom uzorku iznosile: 62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -merkaptoetanol, 0,1 M ditiotritol i 0,01% bromofenol-plavo, pH 6,8. Ovako pripremljeni uzorci su zatim inkubirani 5 min na 96°C i neposredno korišćeni ili čuvani na -20°C do upotrebe.

3.16.2. Elektroforeza, transfer proteina na membranu, detekcija i kvantifikacija proteina

Gel za elektroforezu se sastojao od dela za koncentrovanje uzoraka (3% gel: 4,575 mL dH₂O, 1,875 mL 0,5 M Tris-HCl, 75 μ L 10% SDS, 0,9975 mL 30% akrilamid/bis-akrilamid, 37,5 μ L 10% amonijum-persulfat, 7,5 μ L TEMED, pH 6,8) i dela za razdvajanje uzoraka (12% gel: 3,35 mL dH₂O, 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl, 100 μ L 10% SDS, 4 mL 30% akrilamid/bis-akrilamid, 50 μ L 10% amonijum-persulfat, 5 μ L TEMED, pH 8,8; 7,5% gel: 4,85 mL dH₂O, 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl, 100 μ L 10% SDS, 2,5 mL 30% akrilamid/bis-akrilamid, 50 μ L 10% amonijum-persulfat, 5 μ L TEMED, pH 8,8).

Jednake količine uzoraka (10–15 μ g proteina) su nalivane u bunariće poliakrilamidnog gela koji sadrži SDS, a proteinski marker je nalivan u zasebni bunarić. Proteini su prvo kratko razdvajani u strujnom kolu pri konstantnom naponu od 120 V, dok uzorci nisu ušli u gel za razdvajanje, a potom do kraja gela pri konstantnom naponu od 200 V u Mini-PROTEAN Tetra Cell aparatu (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, SAD). Potom su razdvojeni proteini prenošeni na Immun-Blot PVDF membranu (poliviniliden-fluorid, veličina pora 0,2 μ m; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, SAD) pri konstantnom naponu od 100 V u trajanju od 135 do 140 min. Nakon završenog transfera, membrane su blokirane 2 h na sobnoj temperaturi u puferu TBS (eng. *Tris-buffered saline*: 10 mM Tris base, 100 mM NaCl, pH 7,4) koji je sadržao 0,1% Tween-20 (TBS/Tween) i 5% BSA kada je analizirana fosforilacija proteina, odnosno 5% nemasnog mleka u prahu kada je analiziran ukupni nivo proteina. Nakon blokiranja, membrane su inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelima. Antitela protiv fosfo-eNOS (1:1.000), fosfo-ERK1/2 (1:2.000), fosfo-Akt (1:1.000), eNOS (1:1.000), ERK2 (1:1.000), Akt (1:1.000), ZO-1 (1:1.000), okludina (1:500) i GAPDH (1:3.000) su rastvarana u rastvoru 5% BSA u odnosima koji su navedeni u zagradama. Membrane su zatim inkubirane u rastvorima sa primarnim antitelima preko noći, na 4°C, uz konstantno mešanje. Sledećeg dana su membrane ispirane puferom TBS/Tween pet puta po 5 min na sobnoj temperaturi, a nakon toga su inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi u rastvoru odgovarajućeg sekundarnog antitela konjugovanog sa peroksidazom rena (eng. *horse raddish peroxidase*, HRP; 1:3.000) u TBS/Tween koji je sadržao 5% BSA. Zatim su membrane tri puta naizmenično ispirane 5 min na sobnoj temperaturi puferom TBS koji je sadržao 1% NP-40 (NTBS), potom 5 min na sobnoj temperaturi puferom TBS. Signal na membranama je razvijan pomoću hemiluminescentnog supstrata SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate. Hemiluminescencija je merena aparatom myECL Digital Imaging System (Thermo Scientific), a dobijeni signali su kvantifikovani pomoću programa NIH Image J (Schneider i sar., 2012). Da bi se uklonile potencijalne razlike u nanošenju uzoraka na gel, sa membrana su uklanjana vezana antitela postupkom tzv. stripovanja membrana (eng. *membrane stripping*) korišćenjem pufera za stripovanje (65 mM Tris-HCl, 20% SDS i 0,7% β -merkaptoetanol, pH 6,7), na taj način što su membrane

inkubirane u navedenom puferu 30 min na 56°C. Stripovane membrane su ispirane pet puta puferom NTBS i jednom puferom TBS, potom blokirane i ponovo inkubirane preko noći na 4°C u rastvoru primarnog antitela koje se ili vezuje za endogenu kontrolu (GAPDH) ili za nefosforilisanu formu proteina čija je fosforilacija prethodno detektovana: eNOS (Ser1177), ERK1/2 (Thr202/Tyr204) i Akt (Ser473). Sledećeg dana su membrane inkubirane u rastvoru odgovarajućeg sekundarnog antitela, a hemiluminescentni signali su detektovani i kvantifikovani kao što je prethodno opisano.

3.17. Statistička analiza

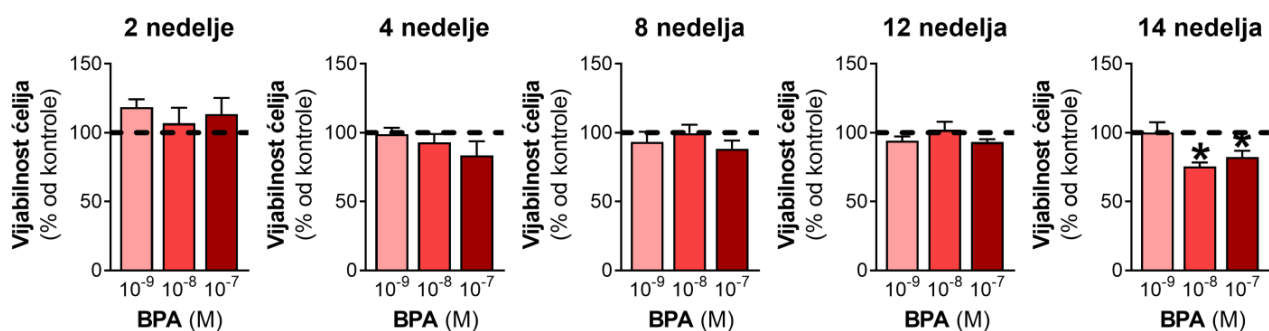
Za potrebe statističke analize podataka dobijenih nakon dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija BPA ili DBP, rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti od tri ili četiri nezavisna ponavljanja (flaska), redom, sa standardnom greškom srednje vrednosti (eng. *standard error of mean*, \pm SEM). Za potrebe statističke analize podataka dobijenih nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija BPA ili DBP, rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti od 3 do 8 ponavljanja \pm SEM. Statistička obrada rezultata je urađena korišćenjem jednosmerne ili dvosmerne analize varijanse (ANOVA) pomoću programa Prism8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, SAD). Post-hoc analiza nakon jednosmerne ANOVA je urađena pomoću testa po Dunnett-u (eng. *Dunnett's multiple comparison post-hoc test*) za poređenje rezultata različitih tretmana sa kontrolom, dok je nakon dvosmerne ANOVA korišćen test po Tukey-u (eng. *Tukey's multiple comparison post-hoc test*) za višestruko međusobno poređenje. Kriterijum statističke značajnosti je u svim statističkim analizama bila granica verovatnoće od $p < 0,05$.

4. Rezultati

4.1. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A

4.1.1. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na vijabilnost ćelija

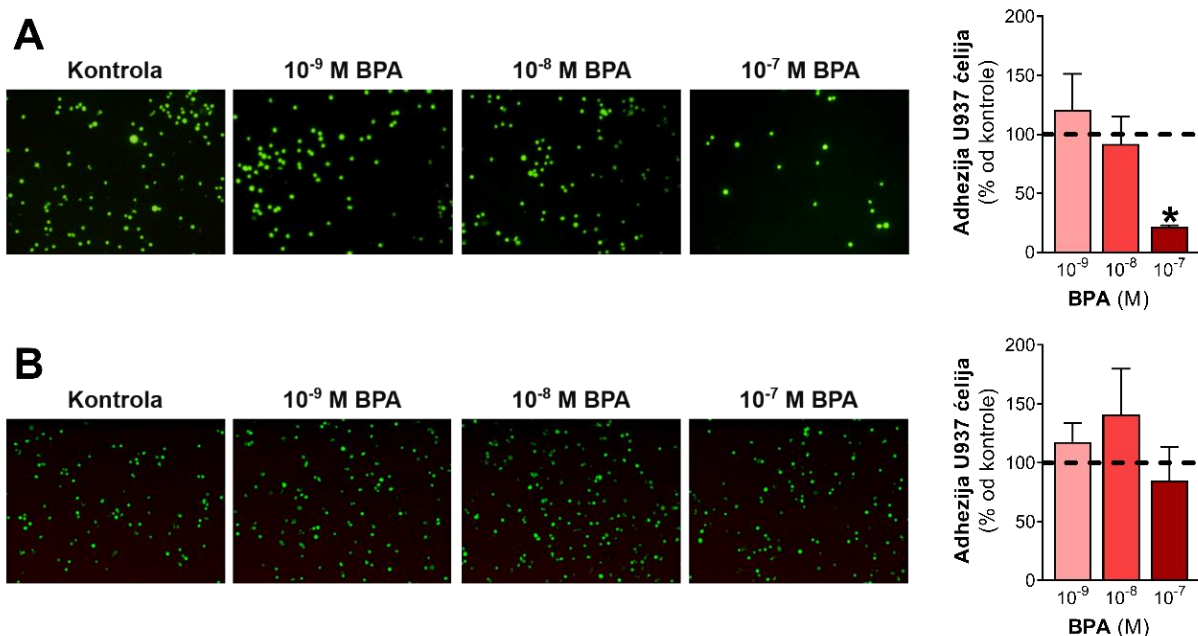
Test sa bojom alamarBlue™ je korišćen za procenu metaboličke aktivnosti ćelija nakon dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA, a što posredno predstavlja parametar za procenu vijabilnosti ćelija. Analiza metaboličke aktivnosti ćelija je pokazala da odabrane nanomolarne koncentracije BPA ne dovode do značajnih promena u vijabilnosti EA.hy926 ćelija nakon dve, četiri, osam i dvanaest nedelja izlaganja, dok je nakon četrnaest nedelja izlaganja ćelija 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA uočeno smanjenje vijabilnosti ćelija od ~25% i 18%, redom (slika 4.1.1).



Slika 4.1.1. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na vijabilnost ćelija. Nakon dve, četiri, osam, dvanaest i četrnaest nedelja dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na metaboličku aktivnost/vijabilnost ćelija korišćenjem testa sa bojom alamarBlue™. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat vijabilnosti u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.1.2. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelih ćelija

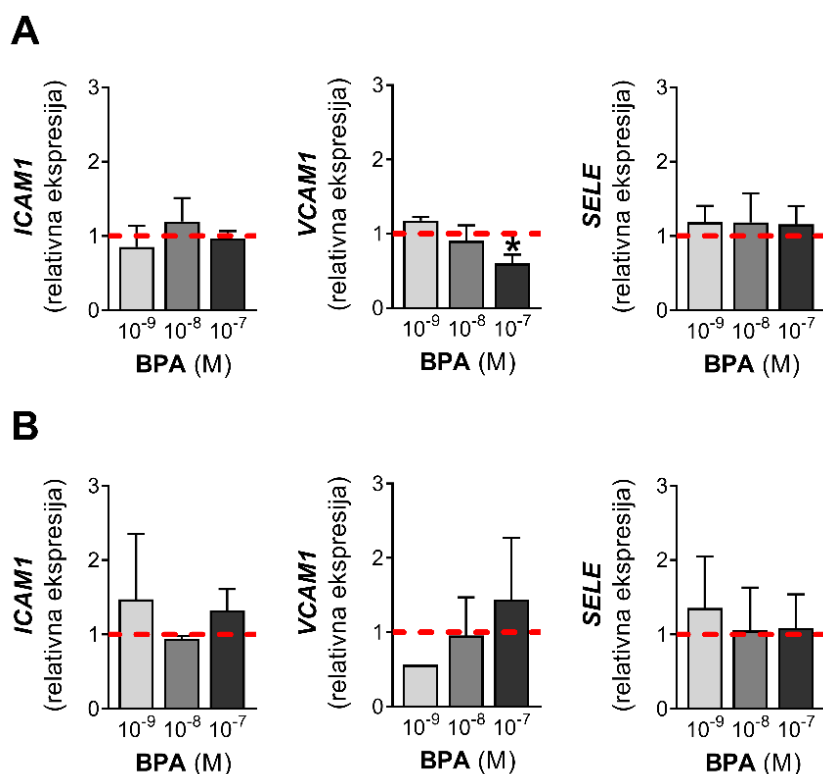
Rezultati ispitivanja vezivanja ćelijske linije humanih monocita U937 za jednosloj endotelih ćelija u uslovima *in vitro* su pokazali da je nakon pet nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA došlo do značajno smanjenog vezivanja U937 ćelija za EA.hy926 ćelije koje su bile izlagane 10^{-7} M BPA u odnosu na kontrolu (za ~78%), dok je ovaj efekat izostao sa drugim koncentracijama BPA (slika 4.1.2A). Smanjeno vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelih ćelija nije zapaženo nakon devet nedelja (rezultati nisu prikazani) i četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama BPA (slika 4.1.2B).



Slika 4.1.2. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija. Nakon (A) pet i (B) četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na vezivanje monocita za jednosloj EA.hy926 ćelija korišćenjem U937 ćelija obeleženih kalceinom AM. Prikazane su reprezentativne fluorescentne fotomikrografije. Srednja vrednost broja fluorescentno obeleženih U937 ćelija vezanih za jednosloj EA.hy926 ćelija je dobijena iz 6–12 nasumično odabranih mikroskopskih polja po grupi, a dobijene vrednosti su zatim izražene kao procenat vezivanja U937 ćelija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.1.3. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule

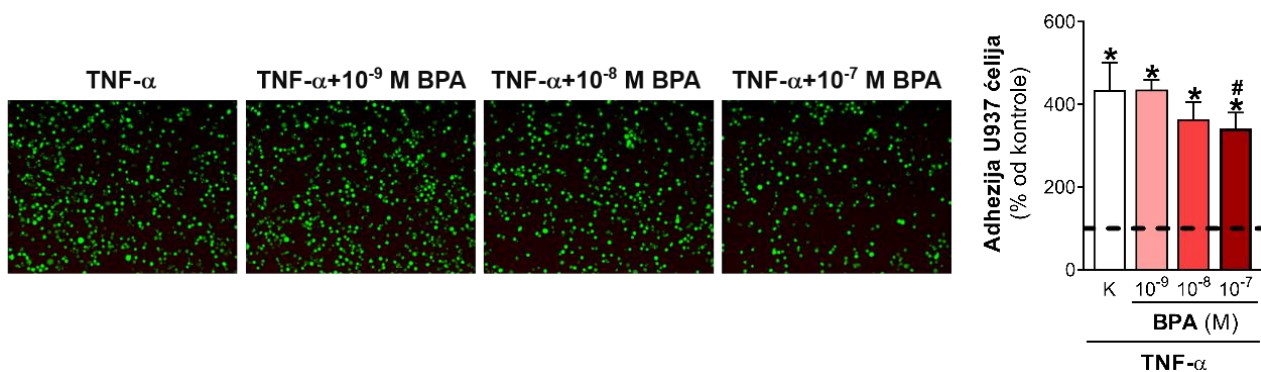
S obzirom na to da su prethodni rezultati pokazali razlike u vezivanju U937 ćelija za EA.hy926 ćelije, u sledećem koraku je određivana relativna ekspresija gena za odabrane CAM koji imaju ulogu u vezivanju monocita za jednosloj endotelnih ćelija. Rezultati određivanja relativne ekspresije gena koji kodiraju ICAM-1, VCAM-1 i E-selektin korišćenjem metode RT-qPCR su pokazali da je nakon pet nedelja izlaganja ćelija 10^{-7} M BPA ekspresija gena za VCAM-1 smanjena za 40% u odnosu na kontrolu, dok ostale ispitivane koncentracije nisu imale efekta. Relativna ekspresija gena za ICAM-1 i E-selektin nije bila promenjena nakon pet nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama BPA (slika 4.1.3A). U skladu sa prethodnim rezultatima koji nisu pokazali razlike u vezivanju U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija nakon četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA, nisu zapažene ni značajne razlike u relativnoj ekspresiji gena koji kodiraju ICAM-1, VCAM-1 i E-selektin nakon četrnaest nedelja izlaganja ćelija datim koncentracijama BPA (slika 4.1.3B).



Slika 4.1.3. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule. Nakon (A) pet i (B) četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju gena za ICAM-1 (*ICAM1*), VCAM-1 (*VCAM1*) i E-selektin (*SELE*) korišćenjem metode RT-qPCR. Dobijene vrednosti su izražene kao relativna ekspresija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.1.4. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija nakon stimulacije sa faktorom nekroze tumora- α

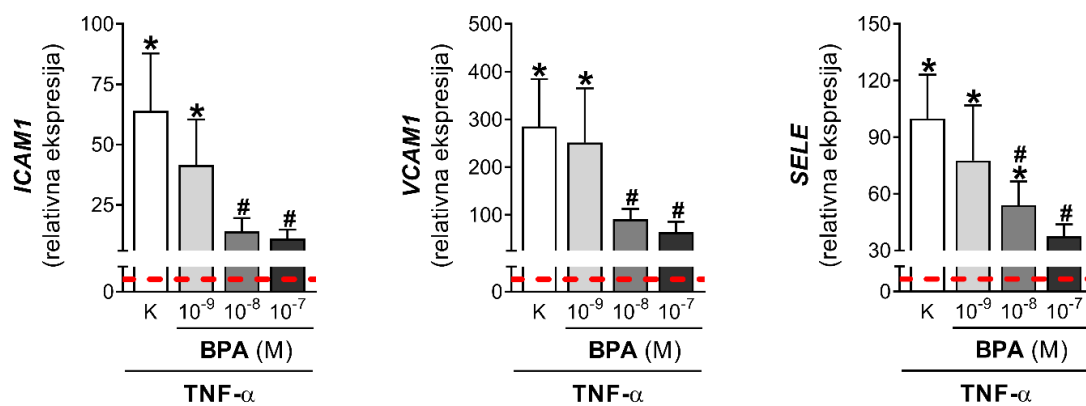
S obzirom na to da se monociti vezuju za endotel u organizmu uglavnom u uslovima povećane inflamacije koju karakteriše prisustvo brojnih inflamacijskih medijatora poput TNF- α , ispitan je uticaj stimulacije EA.hy926 ćelija sa TNF- α na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija, a potom i uticaj dugotrajnog 14-nedeljnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA na ovaj proces. Pokazano je da izlaganje EA.hy926 ćelija TNF- α u trajanju od 24 h značajno povećava vezivanje U937 ćelija za endotelne ćelije (preko 400% u odnosu na nestimulisanu kontrolu). Međutim, ovaj efekat je u izvesnoj meri poništen nakon četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-7} M BPA. Rezultati su pokazali za ~21% smanjeno vezivanje U937 ćelija za EA.hy926 ćelije dugotrajno izlagane 10^{-7} M BPA, a zatim stimulisane sa TNF- α , u odnosu na kontrolnu grupu ćelija koje su dugotrajno izlagane rastvaraču, a zatim stimulisane sa TNF- α (slika 4.1.4).



Slika 4.1.4. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na adheziju U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija nakon stimulacije sa TNF- α . Nakon četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana i stimulacije sa 10 ng/mL TNF- α tokom poslednjih 24 h izlaganja na vezivanje monocita za jednosloj EA.hy926 ćelija korišćenjem U937 ćelija obeleženih kalceinom AM. Prikazane su reprezentativne fluorescentne fotomikrografije. Srednja vrednost broja fluoresescentno obeleženih U937 ćelija vezanih za jednosloj EA.hy926 ćelija je dobijena iz 6–10 nasumično odabranih mikroskopskih polja po grupi, a dobijene vrednosti su zatim izražene kao procenat vezivanja U937 ćelija u odnosu na nestimulisanu kontrolu (bez TNF- α) koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na nestimulisanu kontrolu (bez TNF- α); # $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu stimulisanu sa TNF- α .

4.1.5. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule nakon stimulacije sa faktorom nekroze tumora- α

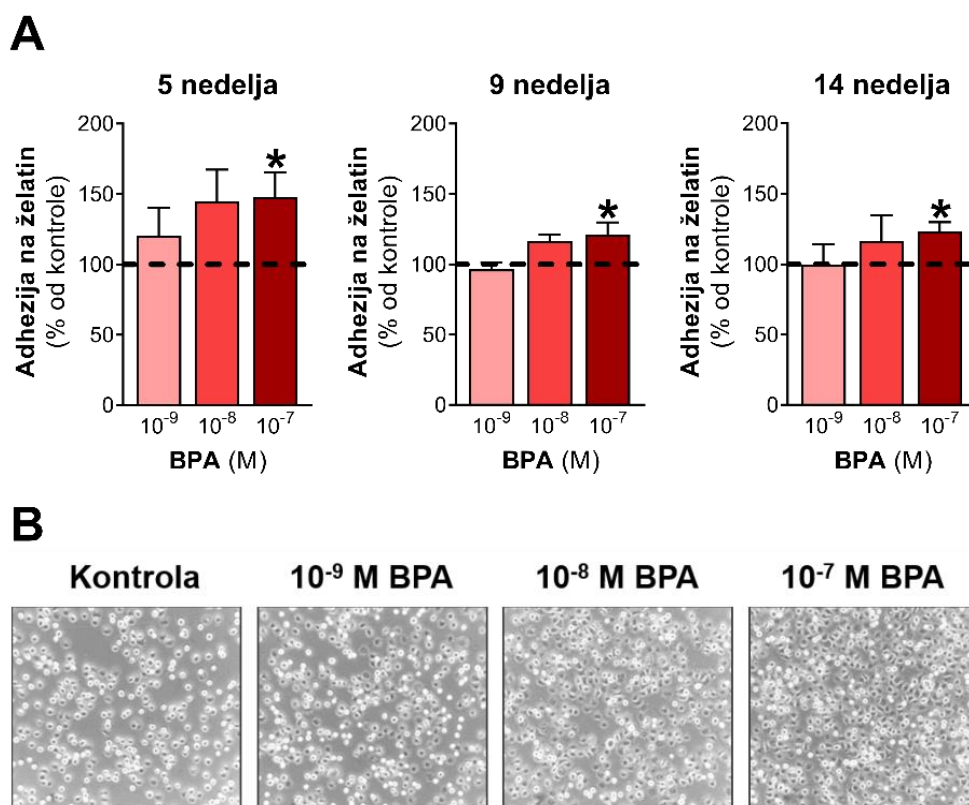
U svetlu prethodno dobijenih rezultata, ispitan je da li stimulacija EA.hy926 ćelija sa TNF- α utiče na relativnu ekspresiju gena za ICAM-1, VCAM-1 i E-selektin, a potom je ispitan i uticaj dugotrajnog 14-nedeljnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA na pomenute parametre nakon stimulacije sa TNF- α . Nakon 14 nedelja izlaganja BPA, ćelije su dodatno stimulisane TNF- α u trajanju od 24 h. Stimulacija TNF- α je u kontrolnoj grupi ćelija značajno povećala ekspresiju gena za ICAM-1 (64 puta), VCAM-1 (285 puta) i E-selektin (100 puta) u odnosu na kontrolu koja nije stimulisana TNF- α . Međutim, u grupama ćelija koje su izlagane 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA je efekat TNF- α izostao, odnosno, izlaganje BPA je poništilo tu stimulaciju. Naime, rezultati su pokazali smanjenu ekspresiju gena za ICAM-1 u grupi ćelija dugotrajno izlaganih 10^{-8} M BPA (za ~78%) i 10^{-7} M BPA (za 82,7%) a zatim stimulisanih sa TNF- α , u odnosu na kontrolnu grupu ćelija dugotrajno izlaganih rastvaraču, a zatim stimulisanih sa TNF- α (stimulisana kontrola). Relativna ekspresija gena koji kodira VCAM-1 je, takođe, smanjena nakon stimulacije sa TNF- α , i to za 68% i 77,7% nakon četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA, redom, u odnosu na kontrolnu grupu stimulisanu TNF- α . Sličan trend pokazuje i relativna ekspresija gena za E-selektin – smanjenje od ~46% i 62,5% nakon četrnaest nedelja izlaganja ćelija 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA, redom, u odnosu na kontrolne grupe ćelija stimulisane TNF- α (slika 4.1.5).



Slika 4.1.5. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule nakon stimulacije sa TNF- α . Nakon četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana i stimulacije sa 10 ng/mL TNF- α tokom poslednjih 24 h izlaganja na ekspresiju gena za ICAM-1 (*ICAM1*), VCAM-1 (*VCAM1*) i E-selektin (*SELE*) korišćenjem metode RT-qPCR. Dobijene vrednosti su izražene kao relativna ekspresija u odnosu na nestimulisanu kontrolu (bez TNF- α) koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na nestimulisanu kontrolu (bez TNF- α); # $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu stimulisanu sa TNF- α .

4.1.6. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na adheziju ćelija za želatin

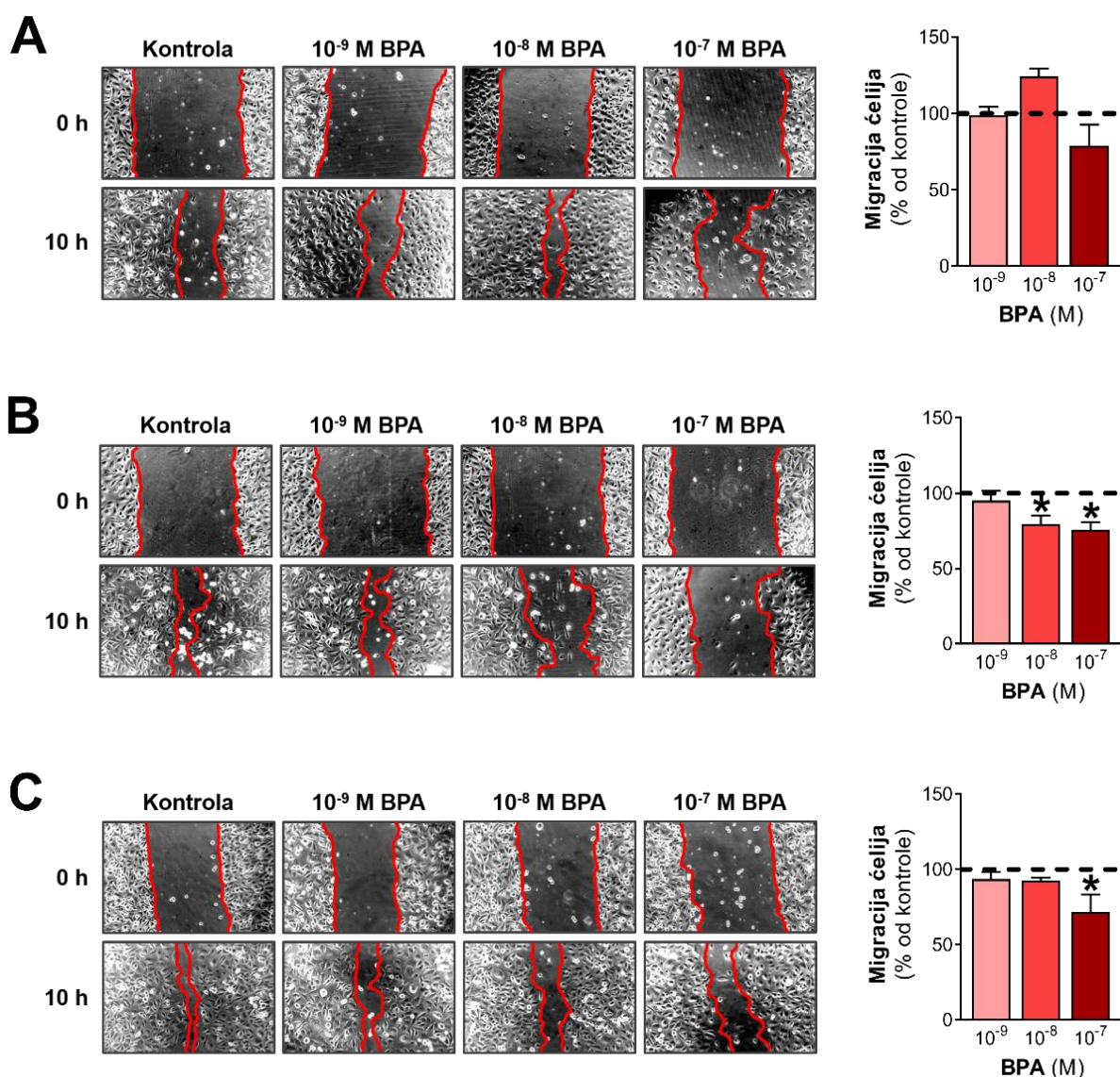
S obzirom na to da je sa jedne strane čvrsta adhezija endotelnih ćelija za komponentne ECM od esencijalne važnosti za očuvanje integriteta endotelne barijere, a da je sa druge strane raskidanje veza između endotelnih ćelija i komponenti ECM neophodno za migraciju ćelija, reparaciju povrede krvnog suda i stvaranje novih krvnih sudova, ispitan je da li dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA utiče na vezivanje ćelija za jedan od proteina ECM – želatin (eng. *gelatin*). Rezultati su pokazali povećano vezivanje EA.hy926 ćelija za želatin tokom dugotrajnog izlaganja ćelija 10^{-7} M BPA, i to za 48%, 21% i 23% nakon pet, devet i četrnaest nedelja, redom. Sa druge dve ispitivane koncentracije BPA, 10^{-9} M i 10^{-8} M, nije zapažen statistički značajan efekat na vezivanje EA.hy926 ćelija za želatin (slika 4.1.6).



Slika 4.1.6. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na adheziju ćelija za želatin. (A) Nakon pet, devet i četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitano je uticaj tretmana na vezivanje ćelija za želatin. Broj vezanih ćelija određen je testom sa bojom SRB. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat adhezije za želatin u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna ćelijska flaska. (B) Reprerzentativne fotomikrografije ilustruju adheziju ćelija na želatin nakon pet nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M). * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.1.7. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na migraciju ćelija

Testom „zarastanja povrede” je u svetlu prethodno dobijenih rezultata ispitano da li dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA utiče na migraciju endotelinih ćelija. Rezultati su pokazali da nakon pet nedelja nema značajnih razlika između EA.hy926 ćelija izlaganih odabranim nanomolarnim koncentracijama BPA i kontrole (slika 4.1.7A). Međutim, nakon devet nedelja je zapaženo smanjenje migracije za oko 20% u odnosu na kontrolu u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-8} M BPA i za oko 25% u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-7} M BPA (slika 4.1.7B). Efekat se nakon četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija održao samo u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-7} M BPA, pri čemu je detektovano smanjenje migracije za ~29% u odnosu na kontrolu (slika 4.1.7C).

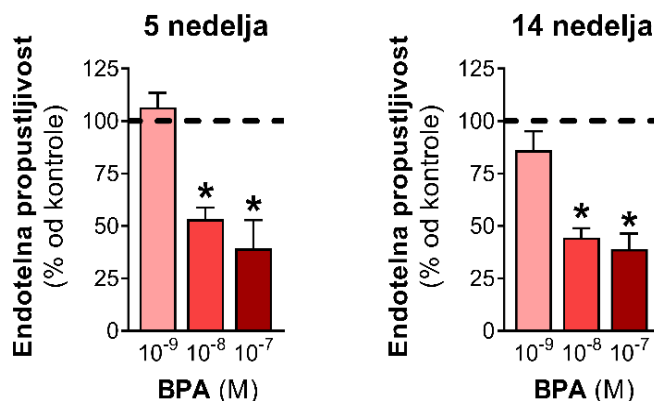


Slika 4.1.7. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na migraciju ćelija. Nakon (A) pet, (B) devet i (C) četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na migraciju ćelija korišćenjem metode „zarastanja povrede“. Prikazane su reprezentativne fotomikrografije u trenutku pravljenja povrede (0 h) i nakon što su ćelije migrirale (10 h). Migracija je kvantifikovana korišćenjem programa Image J kao srednja vrednost 8–10 izmerenih rastojanja između ivica ćelija sa obe strane u trenutku pravljenja povrede i nakon što su ćelije migrirale. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat zatvaranja povrede u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.1.8. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na propustljivost jednosloja endotelnih ćelija

Kako je održavanje polupropustljivog karaktera endotelne barijere od suštinskog značaja za kontrolisanje razmene hranljivih materija, gasova i imunskih ćelija između krvi i intersticijalnog prostora, ispitano je da li dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA utiče na endotelnu propustljivost konfluentnog jednosloja EA.hy926 ćelija. U tu svrhu je korišćen test propustljivosti u Transwell sistemu sa dva odeljka. Rezultati su pokazali da je nakon pet nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA uočeno smanjenje endotelne permeabilnosti za

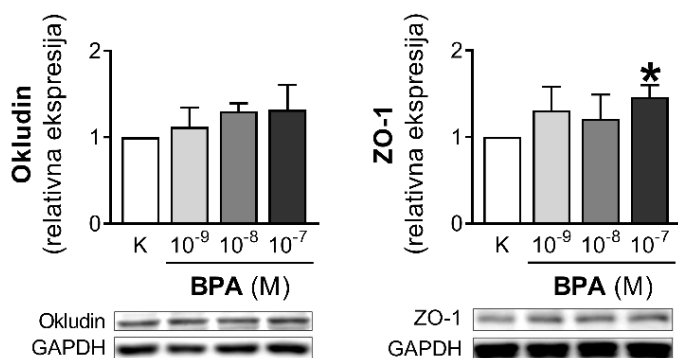
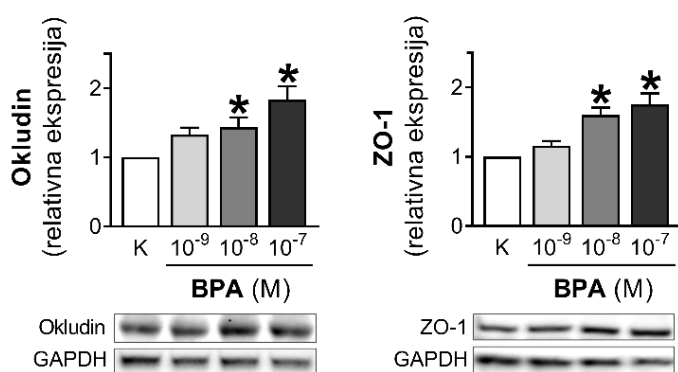
~47% i ~61% u odnosu na kontrolu, redom. Efekat se održao i nakon četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-8} i 10^{-7} M BPA, s obzirom na to da je detektovano smanjenje propustljivosti konfluentnog jednosloja endotelnih ćelija od ~55% i ~61% u odnosu na kontrolu, redom (slika 4.1.8).



Slika 4.1.8. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na endotelnu propustljivost. Nakon pet i četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na propustljivost jednosloja EA.hy926 ćelija korišćenjem dekstrana (Mw 40 kDa) obeleženog fluorescentnom bojom FITC u Transwell sistemu (veličina pora 0,4 μ m). Dobijene vrednosti su izražene kao procenat endotelne propustljivosti u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.1.9. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na ekspresiju okcludina i ZO-1

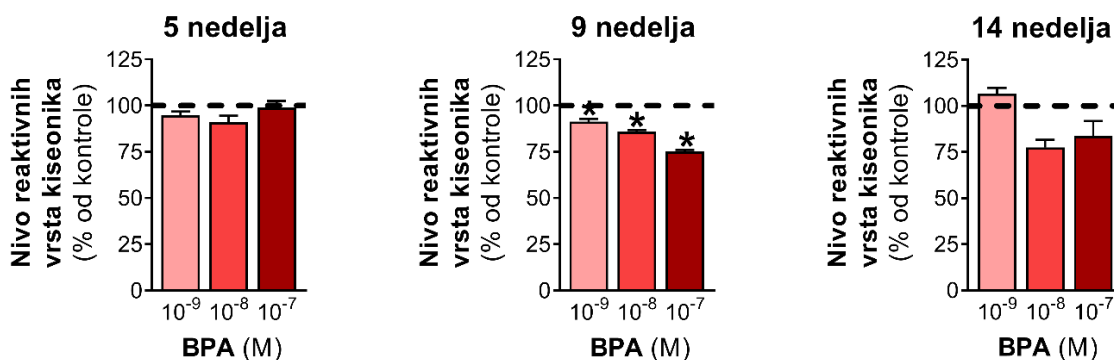
Uzimajući u obzir prethodno navedene rezultate vezane za promene u propustljivosti jednosloja endotelnih ćelija pod delovanjem BPA, u sledećem koraku je ispitan uticaj dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA na ekspresiju dva proteina koji ulaze u sastav TJ, okcludina i ZO-1. Rezultati su pokazali da je nakon pet nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-7} M BPA povećana ekspresija ZO-1 za ~46% u odnosu na kontrolu (slika 4.1.9A), dok je nakon četrnaest nedelja izlaganja ćelija 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA detektovana povećana ekspresija oba proteina u odnosu na kontrolu, i to okcludina za 44% i 84%, a ZO-1 za 60% i 76%, redom (slika 4.1.9B).

A**B**

Slika 4.1.9. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na ekspresiju okludina i ZO-1. Nakon (A) pet i (B) četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju okludina i ZO-1 metodom Western blot. Prikazane su reprezentativne Western blot slike. Kvantifikacija je urađena korišćenjem programa Image J. Dobijene vrednosti za svaki uzorak su normalizovane na nivo GAPDH u datom uzorku, a rezultati su izraženi relativno u odnosu na normalizovani nivo ispitivanog proteina u kontroli (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.1.10. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na nivo reaktivnih vrsta kiseonika

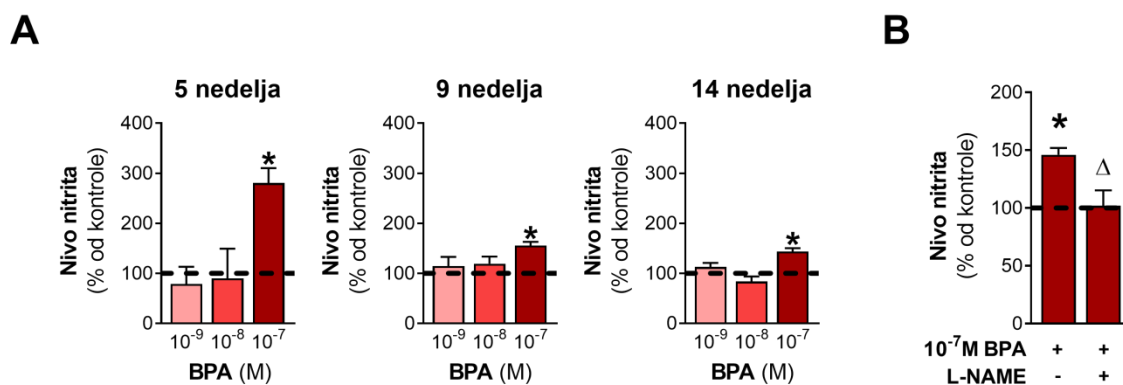
S obzirom na važnu ulogu koju ROS imaju u vaskulaturi, ispitan je uticaj dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA na nivo ROS korišćenjem reagensa H_2DCFDA , koji unutar ćelija reaguje sa različitim ROS stvarajući pri tom jedinjenje DCF sa visokim nivoom fluorescencije. Rezultati su pokazali da nakon pet i četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija svim ispitivanim koncentracijama BPA nisu uočene razlike u nivou ROS, dok je nakon devet nedelja izlaganja ćelija zapaženo smanjenje nivoa ROS sa svim ispitivanim koncentracijama BPA, i to za 8,7% u odnosu na kontrolu u grupi ćelija izlaganih 10^{-9} M BPA, za 14,2% u grupi ćelija izlaganih 10^{-8} M BPA i za 24,7% u grupi ćelija izlaganih 10^{-7} M BPA (slika 4.1.10).



Slika 4.1.10. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na nivo reaktivnih vrsta kiseonika. Nakon pet, devet i četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na nivo ROS korišćenjem reagensa H_2DCFDA . Dobijene vrednosti su izražene kao procenat u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.1.11. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na stvaranje azot-monoksida

Sposobnost endotela da sintetiše NO je od posebnog značaja zbog brojnih plejotropnih funkcija koje ovaj molekul ispoljava u kardiovaskularnom sistemu. S tim u vezi, posredno je ispitan uticaj dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA na stvaranje NO, preko merenja koncentracije nitrita (stabilan proizvod oksidacije NO) u medijumu svih flaskova pre pasaziranja ćelija.

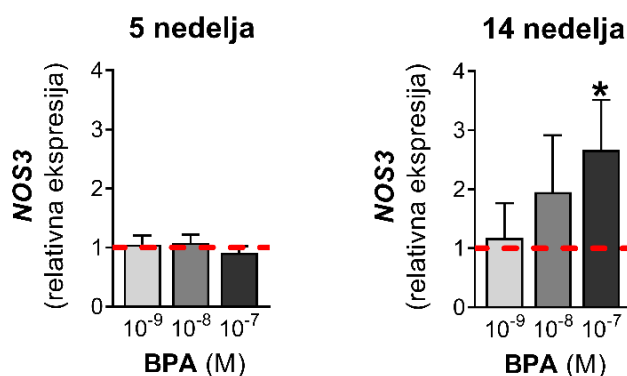


Slika 4.1.11. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na stvaranje azot-monoksida. (A) Nakon pet, devet i četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), posredno je ispitan uticaj tretmana na stvaranje NO preko merenja koncentracije nitrita u medijumu metodom po Griess-u. (B) Nakon četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-7} M BPA posredno je ispitan uticaj navedenog tretmana i dodatnog tretmana sa $100 \mu M$ L-NAME tokom poslednjih 72 h izlaganja na stvaranje NO preko merenja koncentracije nitrita u medijumu metodom po Griess-u. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat nivoa nitrita u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; ^Δ $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na 10^{-7} M BPA.

Rezultati su pokazali da je samo doza od 10^{-7} M BPA dovela do povećanja koncentracije nitrita u medijumu, u svim ispitivanim vremenskim tačkama u odnosu na kontrolu, i to za ~180% nakon pet nedelja, 55% nakon devet i 43% nakon četrnaest nedelja izlaganja (slika 4.1.11A). U cilju dokazivanja specifičnosti dobijenih rezultata, EA.hy926 ćelije su nakon četrnaest nedelja izlaganja 10^{-7} M BPA dodatno tretirane inhibitorom NOS L-NAME, a zatim je posredno ispitan uticaj inhibitora na stvaranje NO preko merenja koncentracije nitrita u medijumu. Rezultati su pokazali da je L-NAME u potpunosti poništio efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-7} M BPA na stvaranje NO (slika 4.1.11B).

4.1.12. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena za eNOS

Metodom RT-qPCR je u svetlu prethodno dobijenih rezultata ispitano da li dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA utiče na relativnu ekspresiju gena za eNOS. Rezultati su pokazali da nakon pet nedelja izlaganja ćelija nisu uočene razlike u ekspresiji *NOS3* (gen koji kodira eNOS) ni sa jednom od ispitivanih koncentracija BPA, dok je nakon četrnaest nedelja izlaganja ćelija 10^{-7} M BPA zapažena povećana ekspresija *NOS3* od 167% u odnosu na kontrolu (slika 4.1.12).

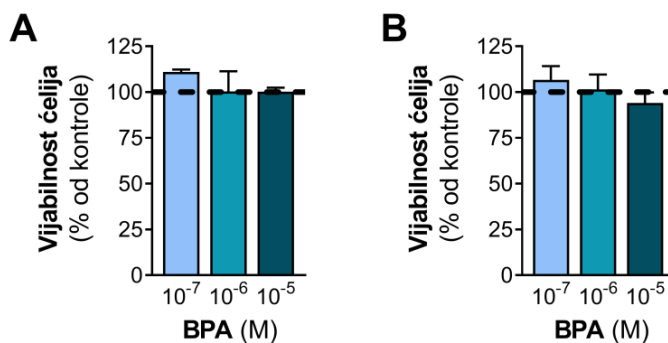


Slika 4.1.12. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena za eNOS. Nakon pet i četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju gena za eNOS (*NOS3*) korišćenjem metode RT-qPCR. Dobijene vrednosti su izražene kao relativna ekspresija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.2. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A

4.2.1. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na vijabilnost ćelija

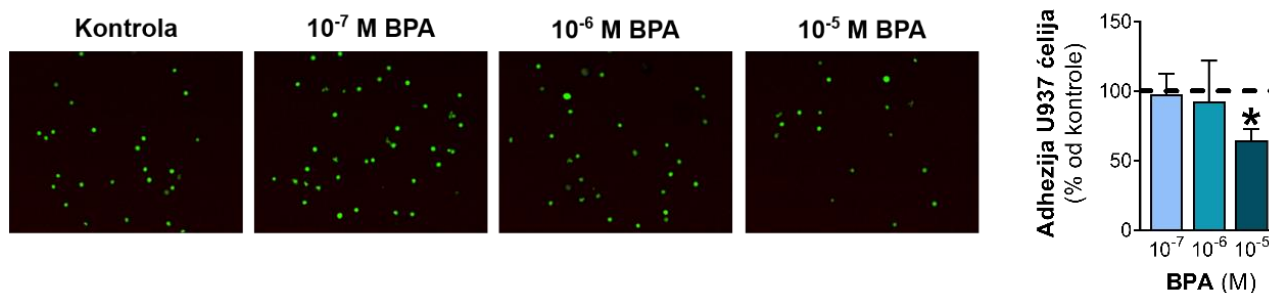
Testom sa bojom alamarBlue™ je ispitan uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M BPA na metaboličku aktivnost/vijabilnost ćelija. Analiza metaboličke aktivnosti je pokazala da odabrane koncentracije BPA ne dovode do značajnih promena u vijabilnosti EA.hy926 ćelija nakon 24 h i 48 h izlaganja (slika 4.2.1).



Slika 4.2.1. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na vijabilnost ćelija. Nakon (A) 24 h i (B) 48 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M), ispitan je uticaj tretmana na metaboličku aktivnost/vijabilnost ćelija korišćenjem testa sa bojom alamarBlue™. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat vijabilnosti u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna eksperimenta.

4.2.2. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija

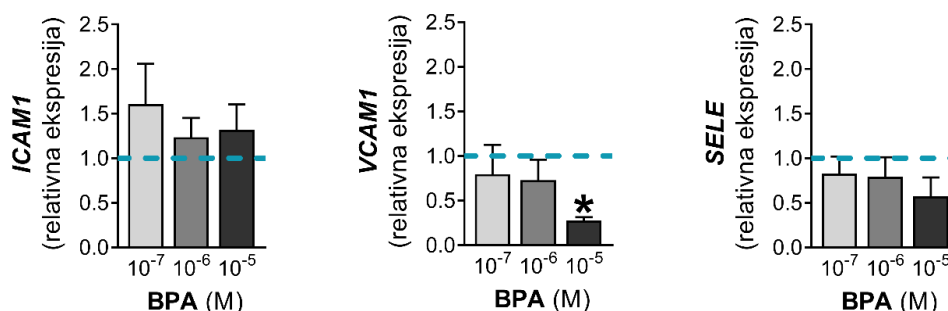
Rezultati ispitivanja vezivanja ćelijske linije humanih monocita U937 za jednosloj endotelnih ćelija u uslovima *in vitro* su pokazali da je nakon 48 h izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M BPA došlo do značajno smanjenog vezivanja U937 ćelija za EA.hy926 ćelije koje su bile izlagane 10^{-5} M BPA, za ~35% u odnosu na kontrolu, dok je ovaj efekat izostao sa drugim koncentracijama BPA (slika 4.2.2).



Slika 4.2.2. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija. Nakon 48 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M), ispitan je uticaj tretmana na vezivanje monocita za jednosloj EA.hy926 ćelija korišćenjem U937 ćelija obeleženih kalceinom AM. Prikazane su reprezentativne fluorescentne fotomikrografije. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat vezivanja U937 ćelija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.2.3. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule

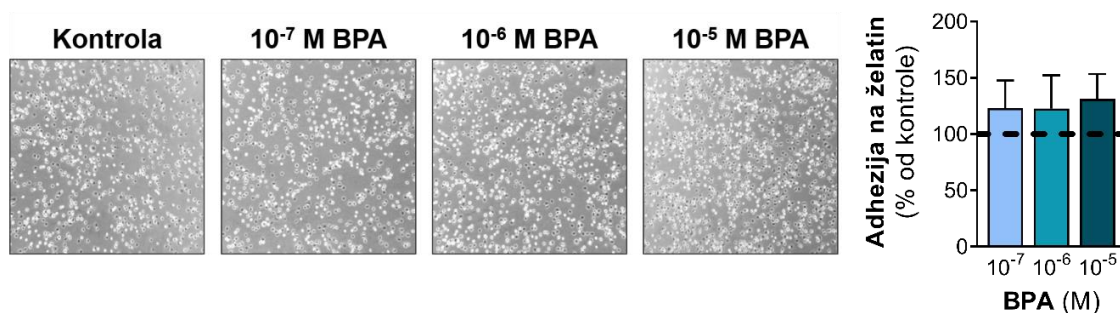
S obzirom na to da je prethodni rezultat pokazao smanjeno vezivanje U937 ćelija za EA.hy926 ćelije izlagane 10^{-5} M BPA, u trajanju od 48 h, u sledećem koraku je određivana relativna ekspresija gena za adhezivne molekule ICAM-1, VCAM-1 i E-selektin. Rezultati određivanja relativne ekspresije gena koji kodiraju ICAM-1, VCAM-1 i E-selektin korišćenjem metode RT-qPCR su pokazali da je nakon 48 h izlaganja ćelija 10^{-5} M BPA ekspresija gena za VCAM-1 smanjena za 73% u odnosu na kontrolu, dok ostale ispitivane koncentracije nisu imale efekta. Ekspresija gena za ICAM-1 i E-selektin nije bila promenjena nakon 48 h izlaganja ćelija odabranim koncentracijama BPA. Treba napomenuti da je nakon izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-5} M BPA relativna ekspresija gena koji kodira E-selektin smanjena za 43% u odnosu na kontrolu, ali ovaj rezultat nije dostigao nivo statističke značajnosti ($p=0,0564$) (slika 4.2.3).



Slika 4.2.3. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule. Nakon 48 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju gena za ICAM-1 (*ICAM1*), VCAM-1 (*VCAM1*) i E-selektin (*SELE*) korišćenjem metode RT-qPCR. Dobijene vrednosti su izražene kao relativna ekspresija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3–4 nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.2.4. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na adheziju ćelija za želatin

U sledećem koraku je ispitan uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M BPA na adheziju ćelija za želatin. Utvrđeno je da vezivanje ćelija za želatin nije promenjeno nakon 24 h izlaganja ćelija odabranim koncentracijama BPA (slika 4.2.4).

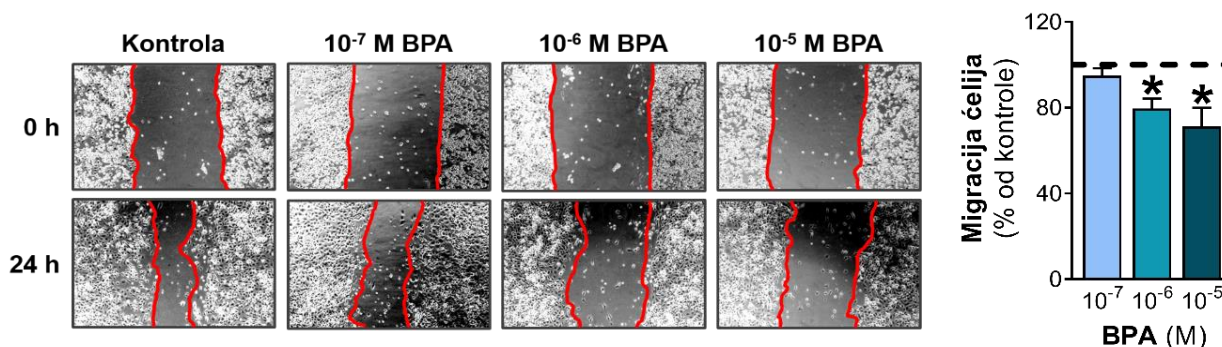


Slika 4.2.4. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na adheziju ćelija za želatin. Nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M), ispitan je uticaj tretmana na vezivanje ćelija za želatin. Prikazane su reprezentativne fotomikrografije. Broj vezanih ćelija određen je testom sa bojom SRB. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat adhezije za želatin u

odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.2.5. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na migraciju ćelija

Testom „zarastanja povrede” je ispitano da li kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M BPA, u trajanju od 24 h, utiče na migraciju endotelnih ćelija. Rezultati su pokazali smanjenje migracije za ~21% u odnosu na kontrolu u grupi ćelija izlaganih 10^{-6} M BPA i za ~29% u grupi ćelija izlaganih 10^{-5} M BPA (slika 4.2.5).



Slika 4.2.5. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na migraciju ćelija. Nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M), ispitano je uticaj tretmana na migraciju ćelija korišćenjem metode „zarastanja povrede“. Prikazane su reprezentativne fotomikrografije u trenutku pravljenja povrede (0 h) i nakon što su ćelije migrirale (24 h). Migracija je kvantifikovana korišćenjem programa Image J kao srednja vrednost 8–10 izmerenih rastojanja između ivica ćelija sa obe strane u trenutku pravljenja povrede i nakon što su ćelije migrirale. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat zatvaranja povrede u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

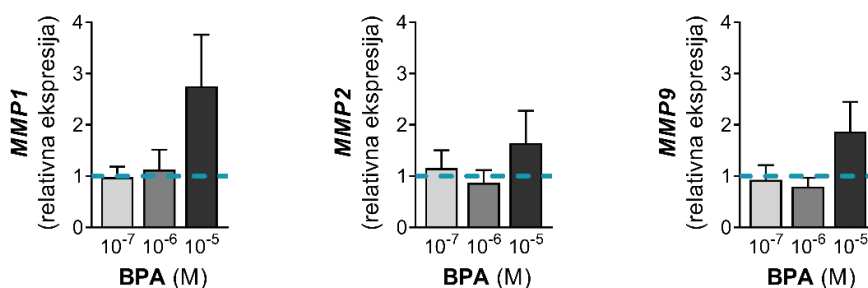
4.2.6. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena i aktivaciju matriksnih metaloproteinaza

U cilju utvrđivanja da li kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M BPA, u trajanju od 24 h, smanjuje migraciju endotelnih ćelija preko smanjene ekspresije ili aktivacije MMP, prvo je ispitano uticaj navedenog izlaganja i tretmana na relativnu ekspresiju tri gena koji kodiraju matriksne metaloproteinaze MMP-1, MMP-2 i MMP-9. Rezultati dobijeni metodom RT-qPCR su pokazali da izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M BPA u trajanju od 24 h ne utiče značajno na ekspresiju gena za MMP-1, MMP-2 i MMP-9 (slika 4.2.6A).

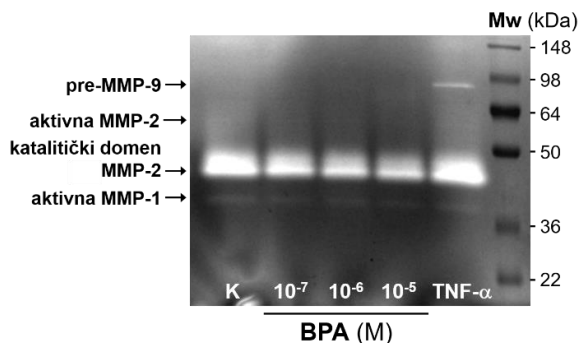
S obzirom na to da su prethodni rezultati pokazali da kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M BPA ne utiče na relativnu ekspresiju gena za tri ispitivane MMP, u sledećem koraku je pomoću želatinske zimografije praćena aktivnost ovih proteolitičkih enzima na poliakrilamidnom gelu kopolimerizovanom želatinom. Određivana je enzimska aktivnost dve MMP iz grupe želatinaza koje su visoko ekspimirane u endotelnim ćelijama, MMP-2 i MMP-9, dok je na zimogramu u izvesnoj meri detektovana i aktivnost MMP-1, enzima koji pripada grupi kolagenaza koje primarno razlažu kolagen, a u manjoj meri i želatin (Snoek-van Beurden i Von den Hoff, 2005). Osim odabranim koncentracijama BPA, ćelije su izlagane i TNF- α , s obzirom na to da ovaj citokin povećava nivo i aktivnost MMP-2 i MMP-9 u endotelnim ćelijama (Chen i sar., 2013).

Rezultati dobijeni želatinskom zimografijom su pokazali da do razgradnje želatina u najvećoj meri dolazi samo aktivacijom MMP-2, detektovane pri molekularnoj masi od ~48 kDa, što odgovara katalitičkom domenu ovog enzima, dok se aktivna i latentna forma MMP-2 pri molekularnim masama od ~62 kDa i ~72 kDa, redom, kao i aktivna i latentna forma MMP-9 pri molekularnim masama od ~82 kDa i ~92 kDa, redom, nisu mogle detektovati na zimogramu (slika 4.2.6B). Na prikazanom zimogramu se uočava da aktivnost MMP-2 nakon 24 h izlaganja 10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M BPA pokazuje dozno-zavisni karakter – smanjuje se sa povećanjem koncentracije BPA, pa se tako najmanja proteolitička aktivnost enzima MMP-2 zapaža u uzorku medijuma dobijenog nakon izlaganja ćelija 10^{-5} M BPA. TNF- α , sa druge strane, povećava enzimsku aktivnost MMP-2. Na zimogramu se uočava i prosvetljena traka koja odgovara enzimskoj aktivnosti prekursorske forme MMP-9. Analizom zimograma zapažaju se i prosvetljene trake koje odgovaraju katalitičkoj aktivnosti aktivne forme enzima MMP-1, s tim da je efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M BPA na aktivnost MMP-1 sličan kao i u slučaju MMP-2 – zapaža se dozno-zavisno smanjenje aktivnosti ovog enzima (slika 4.2.6B).

A



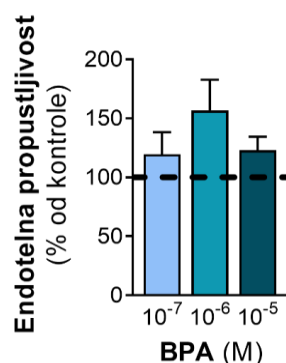
B



Slika 4.2.6. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena i aktivaciju matriksnih metaloproteinaza. (A) Nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju gena za MMP-1 (*MMP1*), MMP-2 (*MMP2*) i MMP-9 (*MMP9*) korišćenjem metode RT-qPCR. Dobijene vrednosti su izražene kao relativna ekspresija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna eksperimenta. (B) Nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M) ili TNF- α (10 ng/mL), ispitan je uticaj tretmana na enzimsku aktivnost MMP u medijumu pomoću želatinske zimografije. Prikazana je reprezentativna fotografija zimograma.

4.2.7. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na propustljivost jednosloja endotelnih ćelija

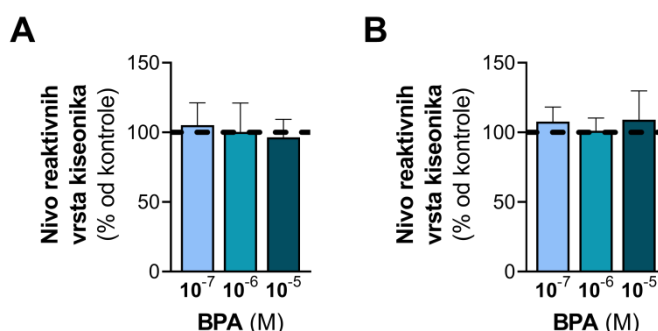
Narednim eksperimentima je ispitano da li kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M BPA, u trajanju od 48 h, utiče na propustljivost endotela, koji je u eksperimentalnim uslovima u Transwell sistemu sa dva odeljka predstavljen konfluentnim jednoslojem EA.hy926 ćelija. Rezultati su pokazali da ni jedna od korišćenih koncentracija BPA ne utiče na propustljivost jednosloja EA.hy926 ćelija (slika 4.2.7).



Slika 4.2.7. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na endotelnu propustljivost. Nakon 48 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M), ispitan je uticaj tretmana na propustljivost jednosloja EA.hy926 ćelija korišćenjem dekstrana (Mw 40 kDa) obeleženog fluorescentnom bojom FITC u Transwell sistemu (veličina pora 0,4 μ m). Dobijene vrednosti su izražene kao procenat endotelne propustljivosti u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna eksperimenta.

4.2.8. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na nivo reaktivnih vrsta kiseonika

Nivo ROS nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M BPA je određivan pomoću reagensa H_2DCFDA . U cilju utvrđivanja da li izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA utiče na stvaranje ROS preko aktivacije postojećih izvora ROS u ćelijama ili preko povećane sinteze enzima koji mogu biti izvori ROS u ćelijama, nivo ROS je određivan u dve vremenske tačke: nakon 30 min i nakon 24 h izlaganja.

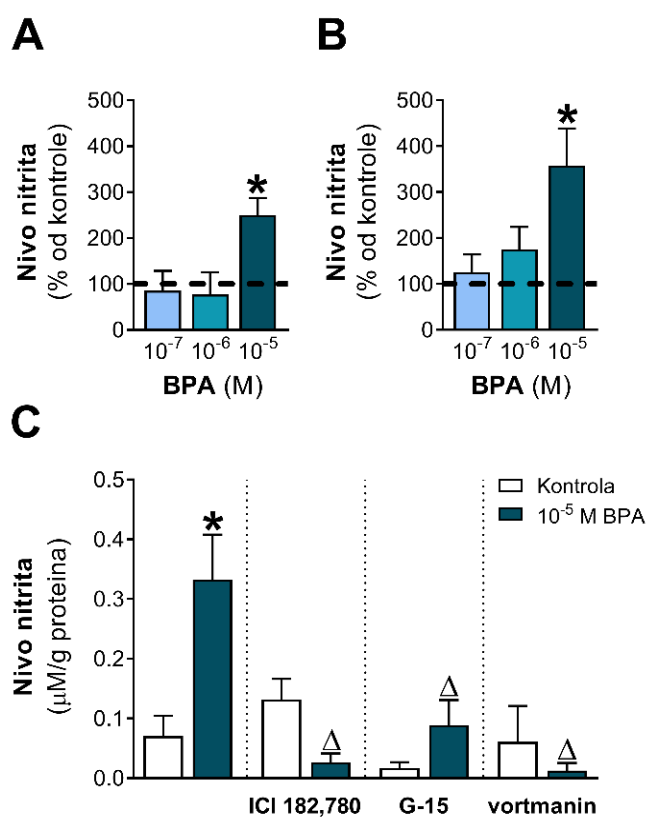


Slika 4.2.8. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na nivo reaktivnih vrsta kiseonika. Nakon (A) 30 min i (B) 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M), ispitan je uticaj tretmana na nivo ROS korišćenjem reagensa H_2DCFDA . Dobijene vrednosti su izražene kao procenat nivoa ROS u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 5 nezavisnih eksperimenata. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

Rezultati su pokazali da izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M BPA ne utiče na nivo ROS ni nakon kratkog izlaganja ćelija u trajanju od 30 min (slika 4.2.8A), ni nakon dužeg izlaganja u trajanju od 24 h (slika 4.2.8B).

4.2.9. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na stvaranje azot-monoksida

U daljem koraku je na indirektan način određivano stvaranje NO preko merenja koncentracije nitrita u medijumu EA.hy926 ćelija, prethodno izlaganih 10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M BPA, u trajanju od 1 h i 48 h. Rezultati su pokazali da je nakon 1 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA detektovan porast koncentracije nitrita u grupi ćelija izlaganih 10^{-5} M BPA za 150% (slika 4.2.9A), dok je nakon 48 h izlaganja ovo povećanje dostiglo 257% (slika 4.2.9B) u odnosu na kontrolu.



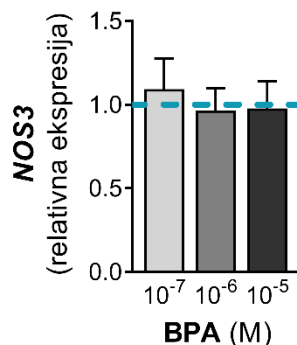
Slika 4.2.9. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na stvaranje azot-monoksida. Nakon (A) 1 h i (B) 48 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M), posredno je ispitan uticaj tretmana na stvaranje NO preko merenja koncentracije nitrita u medijumu metodom po Griess-u. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat nivoa nitrita u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). (C) EA.hy926 ćelije su 45 min pretretirane sa: ICI 182,780 (10 μM), G-15 (10 μM) i vortmaninom (1 μM), a zatim izložene i 10^{-5} M BPA. Nakon 48 h izlaganja posredno je ispitan uticaj pretretmana i BPA na stvaranje NO preko merenja koncentracije nitrita u medijumu metodom po Griess-u. Dobijene vrednosti su izražene u μM nitrita po g proteina. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 3–6 nezavisnih eksperimenata. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; ^Δ $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na 10^{-5} M BPA.

U cilju ispitivanja uloge određenih signalnih puteva u povećanom stvaranju NO nakon izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-5} M BPA u trajanju od 48 h, korišćeni su: ICI 182,780 – antagonist klasičnog ER, G-15 – antagonist GPER i vortmanin – inhibitor PI3K i nishodnih enzima. Rezultati

su pokazali da su sva tri primenjena inhibitora u potpunosti poništala efekat kratkotrajnog izlaganja ćelija 10^{-5} M BPA na stvaranje NO (slika 4.2.9C).

4.2.10. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena za eNOS

U svetlu prethodno dobijenih rezultata je potom metodom RT-qPCR ispitano da li kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M BPA utiče na relativnu ekspresiju gena za eNOS. Rezultati su pokazali da nakon 48 h izlaganja ćelija nisu uočene razlike u ekspresiji *NOS3* ni sa jednom od ispitivanih koncentracija BPA (slika 4.2.10).

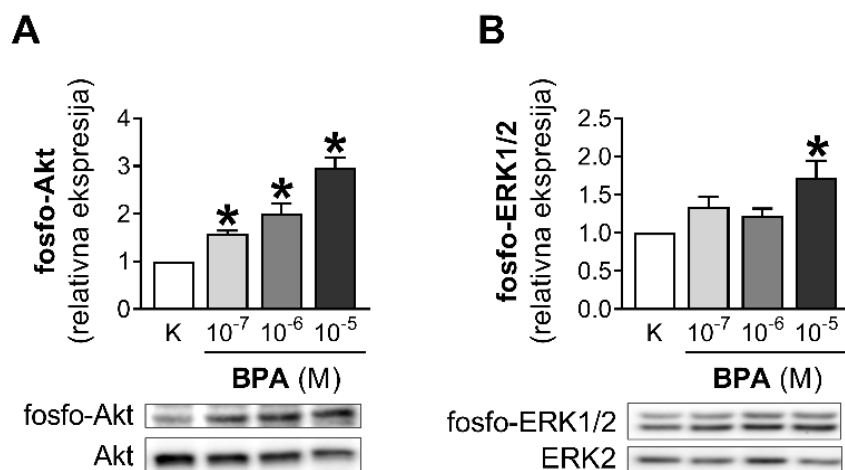


Slika 4.2.10. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na relativnu ekspresiju gena za eNOS. Nakon 48 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M), ispitano je uticaj tretmana na ekspresiju gena za eNOS (*NOS3*) korišćenjem metode RT-qPCR. Dobijene vrednosti su izražene kao relativna ekspresija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna eksperimenta.

4.2.11. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na aktivaciju Akt i ERK1/2

Metoda Western blot je primenjena u cilju identifikacije signalnih puteva koji se u EA.hy926 ćelijama aktiviraju nakon kratkotrajnog izlaganja 10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M BPA.

Nakon izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA u trajanju od 1 h, utvrđeno je povećanje ekspresije fosfo-Akt, i to za ~59%, 100% i 197% u odnosu na kontrolu nakon izlaganja ćelija 10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M BPA, redom (slika 4.2.11A). Pod istim uslovima, povećana ekspresija fosfo-ERK1/2 je detektovana samo nakon izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-5} M BPA, i to za ~72% u odnosu na kontrolu, dok su ostale ispitivane koncentracije BPA bile bez efekta (slika 4.2.11B).

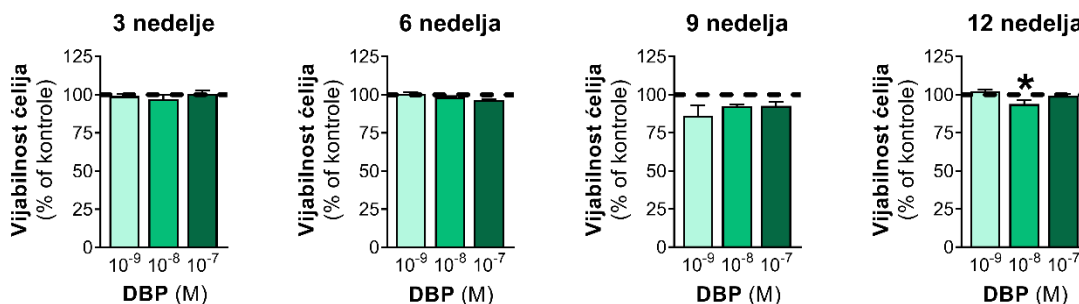


Slika 4.2.11. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A na aktivaciju Akt i ERK1/2. Nakon 1 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-7} M, 10^{-6} M i 10^{-5} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju (A) fosfo-Akt i (B) fosfo-ERK1/2 korišćenjem metode Western blot. Prikazane su reprezentativne Western blot slike. Kvantifikacija je urađena korišćenjem programa Image J. Dobijene vrednosti za svaki uzorak su normalizovane na nivo nefosforilisane forme proteina u datom uzorku, a rezultati su izraženi relativno u odnosu na normalizovani nivo (A) fosfo-Akt i (B) fosfo-ERK1/2 u kontroli (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3–4 nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.3. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu

4.3.1. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na vijabilnost ćelija

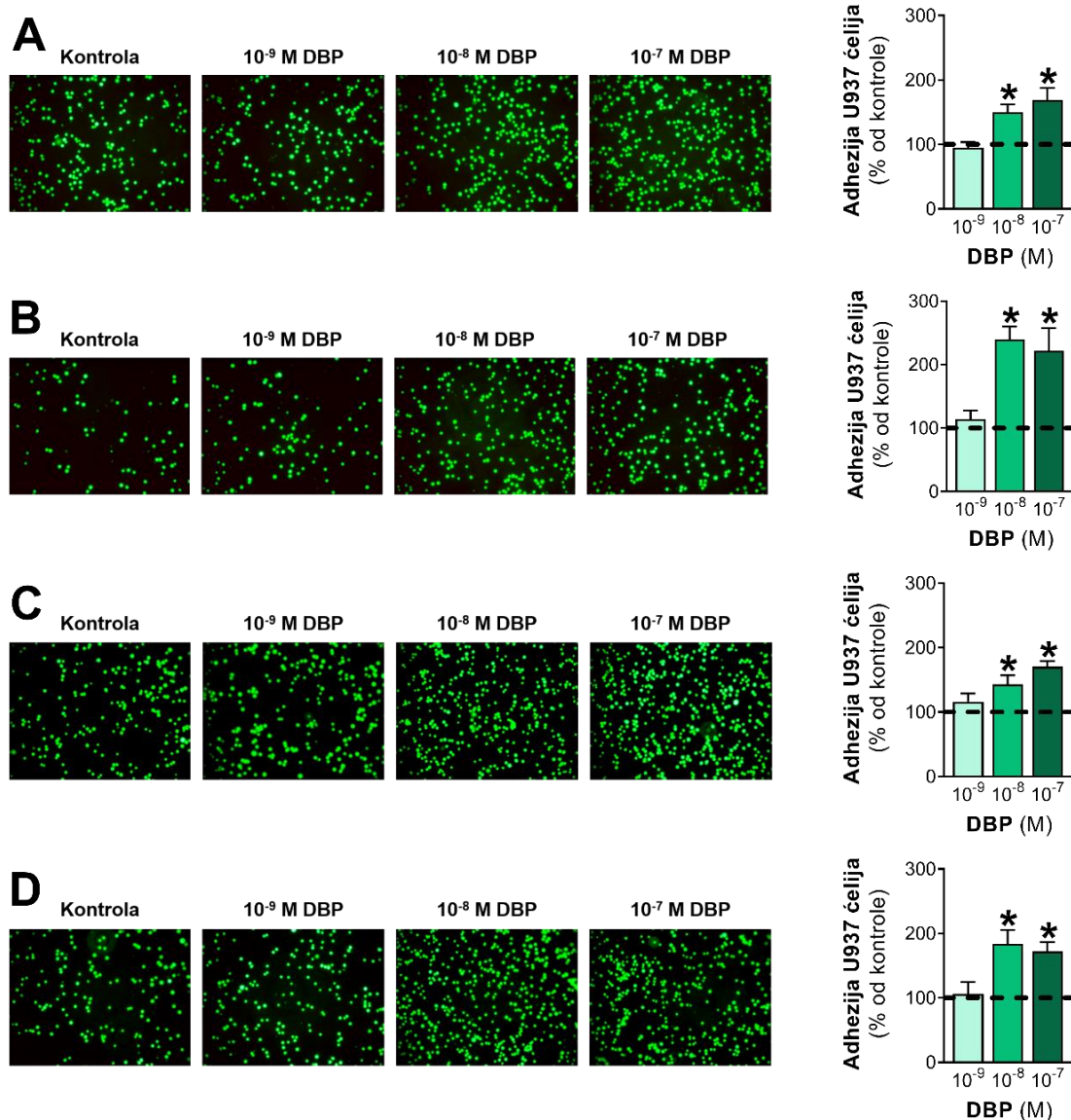
Rezultati ispitivanja metaboličke aktivnosti ćelija testom sa bojom alamarBlue™ nakon dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP su pokazali da je nakon dvanaest nedelja izlaganja ćelija 10^{-8} M DBP detektovano smanjenje vijabilnosti od 6,14% u odnosu na kontrolu. U ostalim ispitivanim nedeljama nije bilo značajnih razlika u vijabilnosti ćelija između tretiranih grupa i kontrole (slika 4.3.1).



Slika 4.3.1. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na vijabilnost ćelija. Nakon tri, šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na metaboličku aktivnost/vijabilnost ćelija korišćenjem testa sa bojom alamarBlue™. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat vijabilnosti u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.3.2. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija

Rezultati ispitivanja vezivanja humanih monocita U937 za jednosloj endotelnih ćelija u uslovima *in vitro* su pokazali da je u svim ispitivanim nedeljama dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP došlo do značajno povećanog vezivanja U937 ćelija obeleženih fluorescentnom bojom kalcein AM za endotelne ćelije koje su izlagane 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP u odnosu na kontrolu: nakon tri nedelje izlaganja za ~50% i 69,3%, redom (slika 4.3.2A), nakon šest nedelja izlaganja za ~140% i ~122%, redom (slika 4.3.2B), nakon devet nedelja izlaganja za 43,25% i 70,3%, redom (slika 4.3.2C) i nakon dvanaest nedelja izlaganja za 83,85% i 72,3%, redom (slika 4.3.2D).

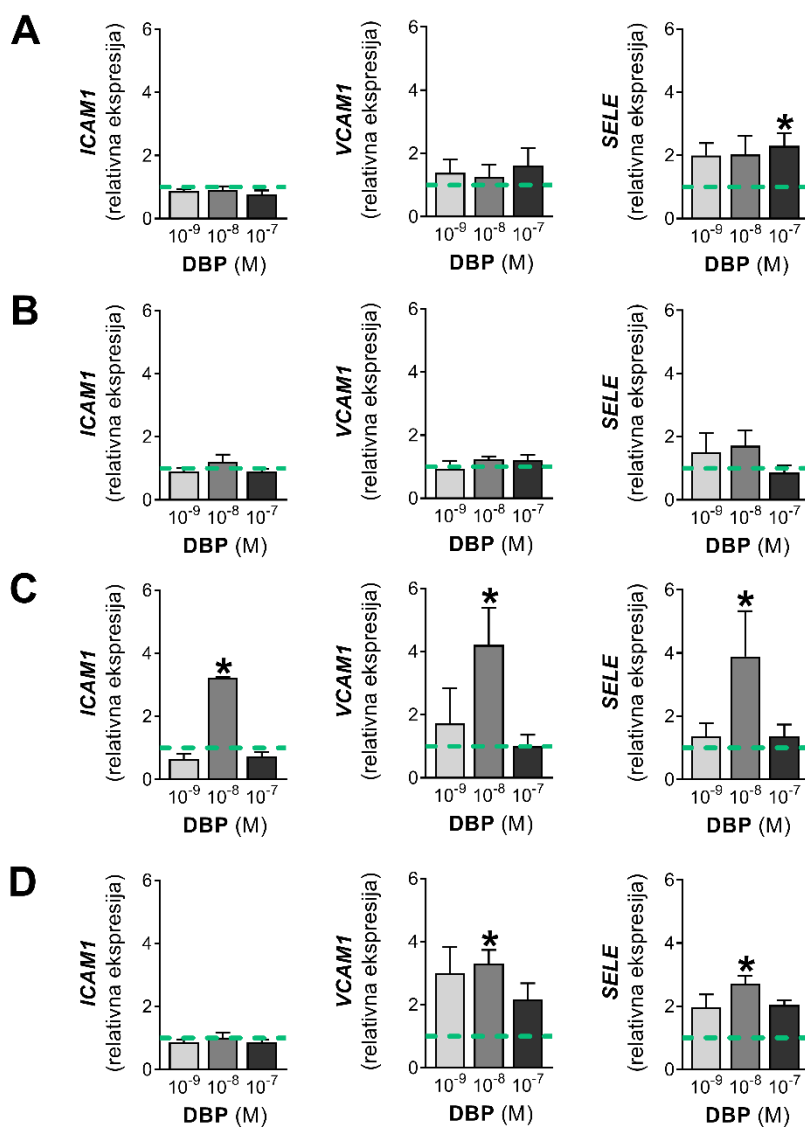


Slika 4.3.2. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija. Nakon (A) tri, (B) šest, (C) devet i (D) dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na vezivanje monocita za jednosloj EA.hy926 ćelija korišćenjem U937 ćelija obeleženih kalceinom AM. Prikazane su reprezentativne fluorescentne fotomikrografije. Srednja vrednost broja fluorescentno obeleženih U937 ćelija vezanih za jednosloj EA.hy926 ćelija je dobijena iz 8–16 nasumično odabranih mikroskopskih polja po grupi, a dobijene vrednosti su zatim izražene kao procenat vezivanja U937 ćelija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.3.3. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule

S obzirom na to da su prethodni rezultati pokazali kontinuirano povećano vezivanje U937 monocita za EA.hy926 ćelije izlagane 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP tokom dvanaest nedelja, u sledećem koraku je određivana relativna ekspresija gena za ICAM-1, VCAM-1 i E-selektin nakon tri, šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP. Rezultati merenja relativne ekspresije gena za ispitivane CAM nakon tri nedelje izlaganja ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP su pokazali povećanu ekspresiju gena koji kodira E-selektin

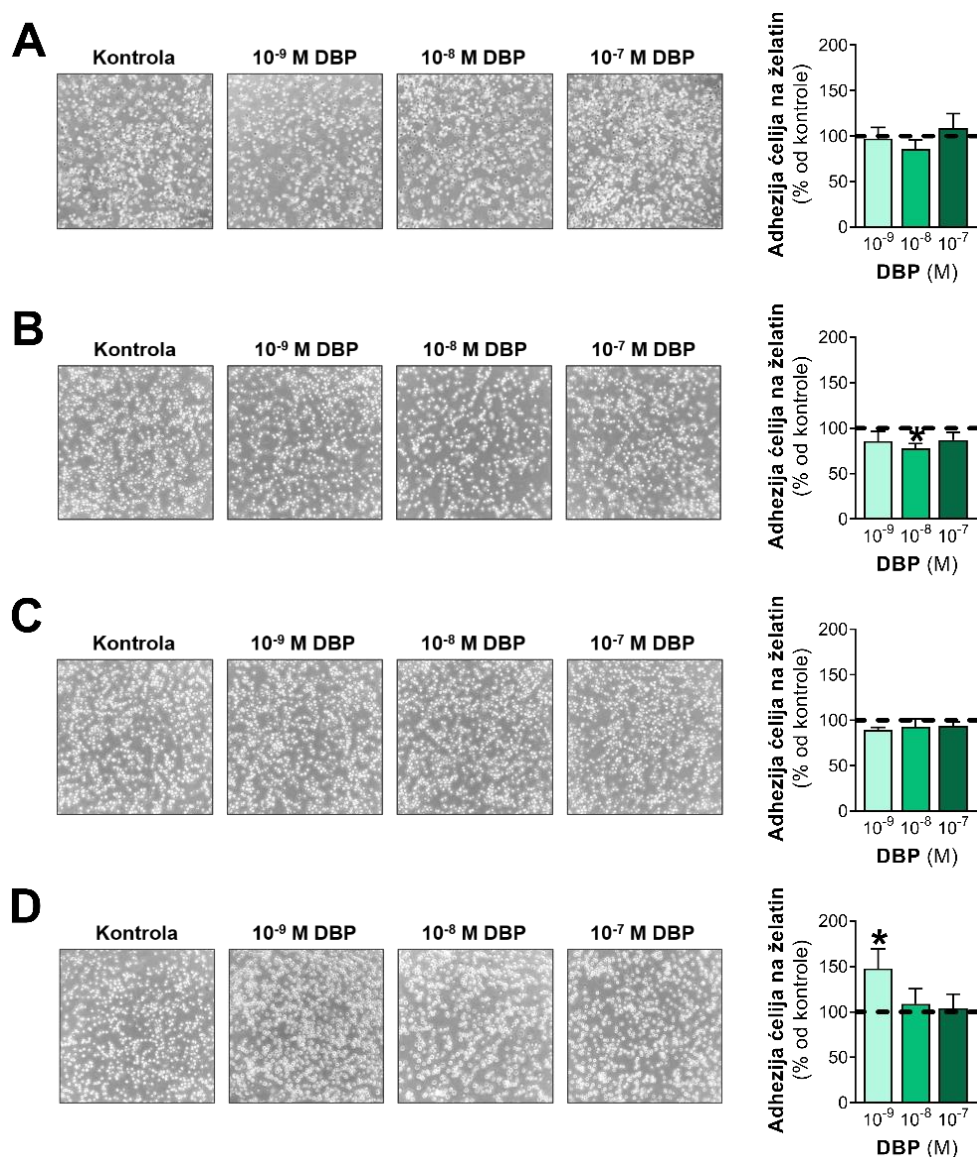
za 130% u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-7} M DBP u odnosu na kontrolu (slika 4.3.3A). Nakon šest nedelja nisu detektovane razlike (slika 4.3.3B), dok je nakon devet nedelja samo koncentracija od 10^{-8} M DBP značajno povećala ekspresiju gena za sva tri ispitivana CAM: ICAM-1 za ~223%, VCAM-1 za 321% i E-selektin za ~289% u odnosu na kontrolu (slika 4.3.3C). Nakon dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP nisu detektovane razlike u ekspresiji gena za ICAM-1 ni sa jednom ispitivanom koncentracijom DBP, dok je povećana ekspresija gena koji kodira VCAM-1 zapažena u grupi ćelija koja su izlagane 10^{-8} M DBP i to za ~230% u odnosu na kontrolu. Pored toga, nakon dvanaest nedelja izlaganja zapažena je i povećana ekspresija gena za E-selektin za ~171% u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-8} M DBP (slika 4.3.3D).



Slika 4.3.3. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule. Nakon (A) tri, (B) šest, (C) devet i (D) dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitivan je uticaj tretmana na ekspresiju gena za ICAM-1 (*ICAM1*), VCAM-1 (*VCAM1*) i E-selektin (*SELE*) korišćenjem metode RT-qPCR. Dobijene vrednosti su izražene kao relativna ekspresija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.3.4. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na adheziju ćelija za želatin

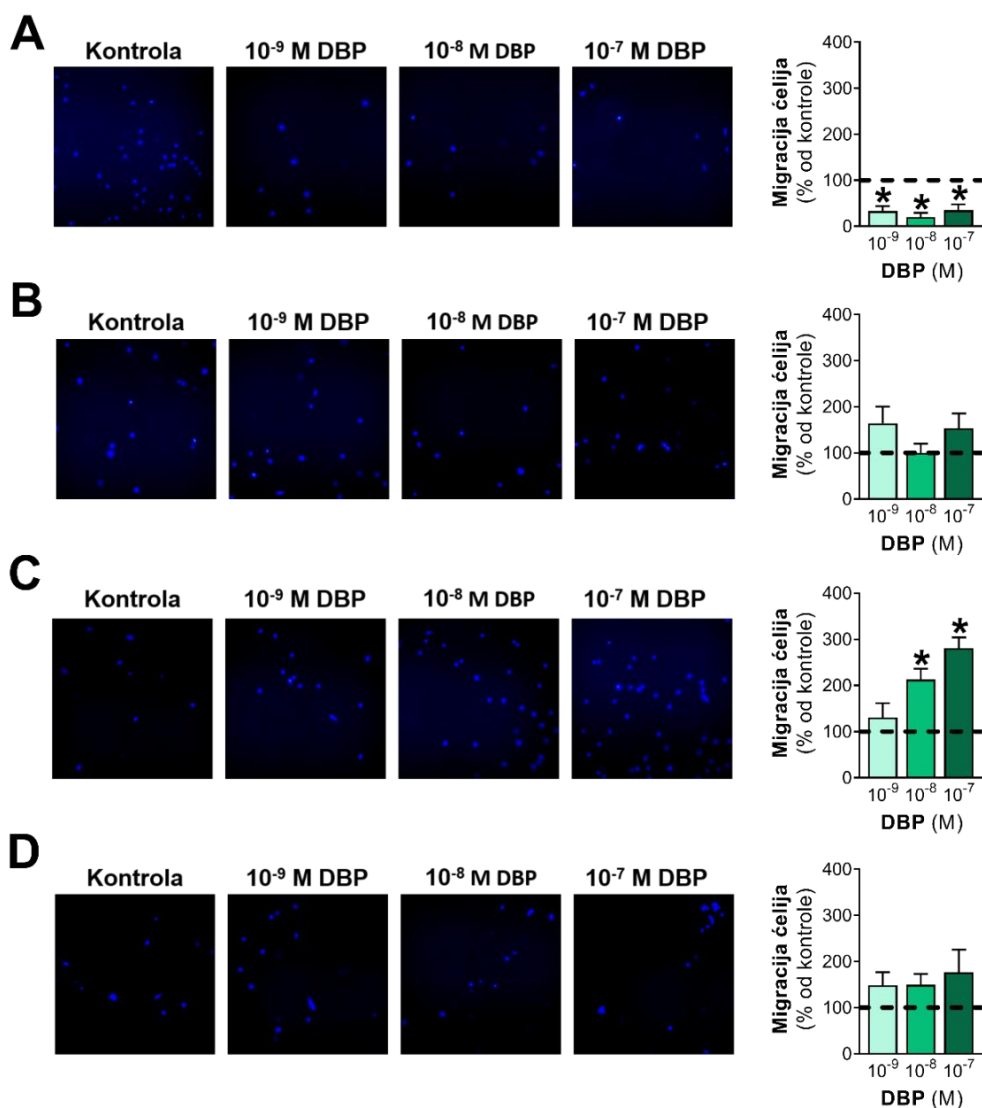
U sledećem koraku je ispitan uticaj dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP na adheziju ćelija za želatin. Rezultati su pokazali da nakon tri nedelje (slika 4.3.4A) i devet nedelja (slika 4.3.4C) izlaganja ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP nije zapažen statistički značajan efekat na vezivanje EA.hy926 ćelija za želatin. Sa druge strane, detektovano je smanjeno vezivanje ćelija za želatin (za ~22% u odnosu na kontrolu) nakon šest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-8} M DBP (slika 4.3.4B), kao i povećano vezivanje (za ~48% u odnosu na kontrolu) u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-9} M DBP u trajanju od dvanaest nedelja (slika 4.3.4D).



Slika 4.3.4. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na adheziju ćelija za želatin. Nakon (A) tri, (B) šest, (C) devet i (D) dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na vezivanje ćelija za želatin. Prikazane su reprezentativne fotomikrografije. Broj vezanih ćelija određen je testom sa bojom SRB. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat adhezije za želatin u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.3.5. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na migraciju ćelija

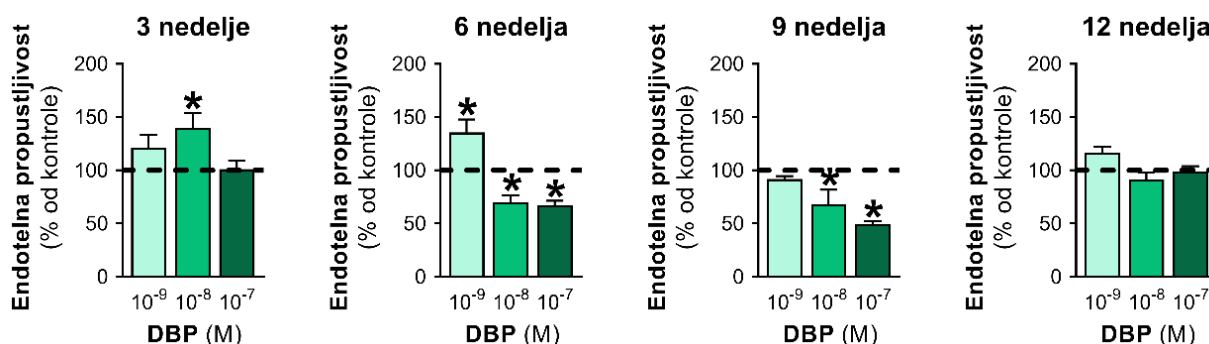
Modifikovanom Boyden Chamber tehnikom u Transwell sistemu je ispitano da li dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP utiče na migraciju endotelnih ćelija. Rezultati su pokazali da izlaganje EA.hy926 ćelija svim navedenim koncentracijama DBP u trajanju od 3 nedelje značajno smanjuje migraciju endotelnih ćelija u odnosu na kontrolu, i to za 67% u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-9} M DBP, za 79,6% u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-8} M DBP i za ~65% u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-7} M DBP (slika 4.3.5A). Nakon šest nedelja (slika 4.3.5B) i dvanaest nedelja (slika 4.3.5D) izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP nije zapažen statistički značajan efekat na migraciju ćelija. Sa druge strane, detektovana je povećana migracija nakon devet nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP, i to za ~113% i ~181%, redom (slika 4.3.5C).



Slika 4.3.5. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na migraciju ćelija. Nakon (A) tri, (B) šest, (C) devet i (D) dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na migraciju ćelija korišćenjem Transwell sistema (veličina pora 8 μ m). Ćelije koje su migrirale kroz polikarbonatnu membranu unutrašnjeg bunarića Transwell ploče su obojene fluorescentnom bojom DAPI. Prikazane su reprezentativne fluorescentne fotomikrografije. Srednja vrednost broja fluorescentno obeleženih ćelija je dobijena iz 8–15 nasumično odabranih mikroskopskih polja po grupi, a dobijene vrednosti su zatim izražene kao procenat ćelija koja su migrirale u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.3.6. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na propustljivost jednosloja endotelnih ćelija

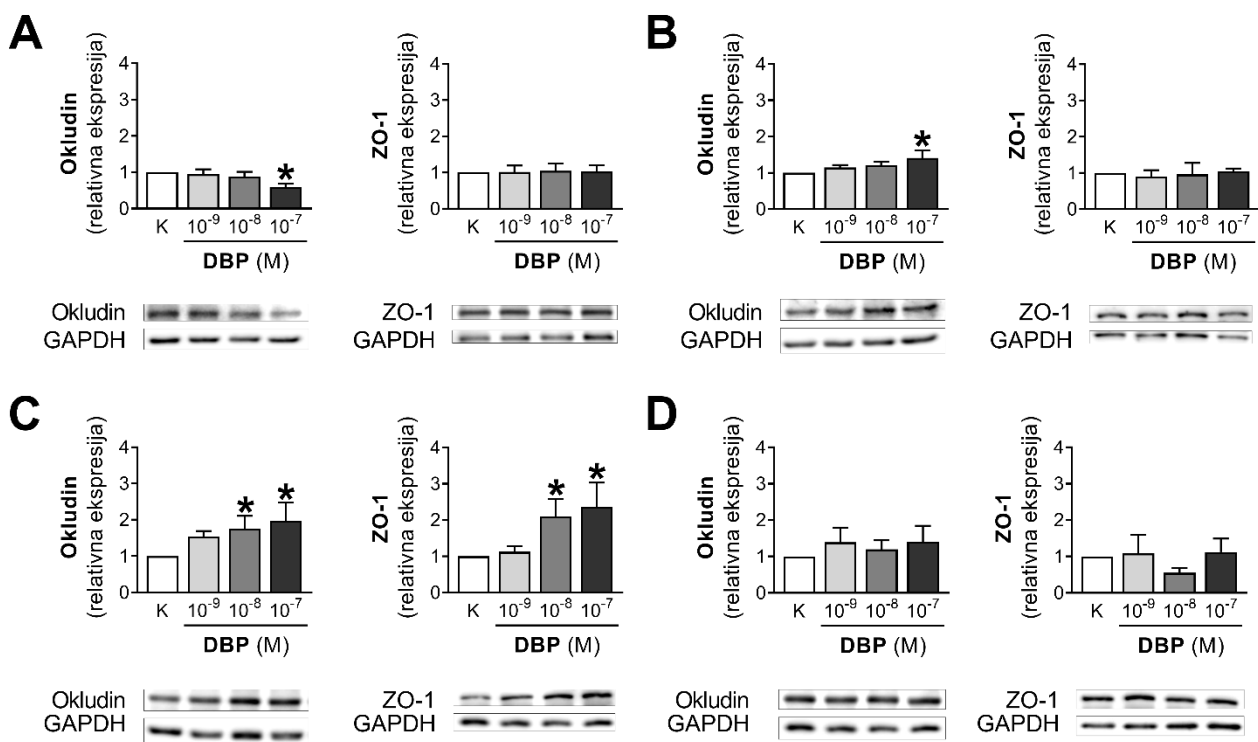
Zatim je ispitano da li dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP utiče na propustljivost konfluentnog jednosloja EA.hy926 ćelija u Transwell sistemu sa dva odeljka. Rezultati su pokazali da je nakon tri nedelje izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-8} M DBP uočeno povećanje endotelne propustljivosti za 40% u odnosu na kontrolu, dok je u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-9} M DBP i 10^{-7} M DBP taj efekat izostao. Nakon šest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP samo je u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-9} M DBP zapaženo povećanje endotelne propustljivosti za ~36% u odnosu na kontrolu, dok je u grupama ćelija koje su izlagane 10^{-8} M DBP i 10^{-7} M DBP uočeno smanjenje endotelne propustljivosti za ~30% i ~33%, redom. Smanjena propustljivost jednosloja endotelnih ćelija je detektovana i nakon devet nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP, i to za 32% i ~51% u odnosu na kontrolu, redom. Nakon dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP nije zapažen značajan efekat na propustljivost jednosloja endotelnih ćelija (slika 4.3.6).



Slika 4.3.6. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na endotelnu propustljivost. Nakon tri, šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na propustljivost jednosloja EA.hy926 ćelija korišćenjem dekstrana (Mw 40 kDa) obeleženog fluorescentnom bojom FITC u Transwell sistemu (veličina pora 0,4 μ m). Dobijene vrednosti su izražene kao procenat endotelne propustljivosti u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.3.7. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na ekspresiju okcludina i ZO-1

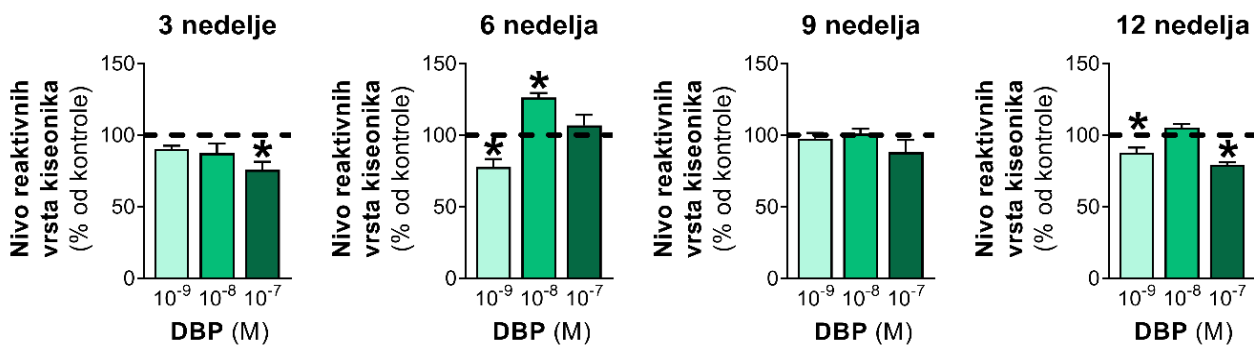
Uzimajući u obzir prethodno navedene rezultate vezane za promene u propustljivosti jednosloja endotelnih ćelija pod delovanjem DBP, u sledećem koraku je ispitan uticaj dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP na ekspresiju okcludina i ZO-1. Rezultati su pokazali da je nakon tri nedelje izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-7} M DBP smanjena ekspresija okcludina za ~41% u odnosu na kontrolu, dok je efekat izostao kad je u pitanju ZO-1 (slika 4.3.7A). Sa druge strane, nakon šest nedelja izlaganja ćelija istoj koncentraciji DBP detektovano je povećanje ekspresije okcludina, i to za ~41% u odnosu na kontrolu, dok je efekat ponovo izostao kad je u pitanju ZO-1 (slika 4.3.7B). Nakon devet nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP, zapažena je povećana ekspresija oba proteina u grupi ćelija izlaganih 10^{-8} M DBP i 10^{-7} M DBP u odnosu na kontrolu, i to okcludina za ~75% i 98%, a ZO-1 za 109,5% i ~137%, redom (slika 4.3.7C). Nakon dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP nije bilo značajnih razlika u ekspresiji okcludina i ZO-1 u odnosu na kontrolu (slika 4.3.7D).



Slika 4.3.7. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na ekspresiju okludina i ZO-1. Nakon (A) tri, (B) šest, (C) devet i (D) dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju okludina i ZO-1 metodom Western blot. Prikazane su reprezentativne Western blot slike. Kvantifikacija je urađena korišćenjem programa Image J. Dobijene vrednosti za svaki uzorak su normalizovane na ekspresiju GAPDH u datom uzorku, a rezultati su izraženi relativno u odnosu na normalizovanu ekspresiju ispitivanog proteina u kontroli (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.3.8. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na nivo reaktivnih vrsta kiseonika

U sledećem koraku je ispitan uticaj dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP na stvaranje ROS korišćenjem reagensa H₂DCFDA. Rezultati su pokazali da je nakon tri nedelje izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP zapaženo smanjenje nivoa ROS od 24,2% u odnosu na kontrolu samo u grupi ćelija koje su izlagane najvećoj koncentraciji DBP, dok su ostale koncentracije DBP bile bez efekta. Nakon šest nedelja je uočeno smanjenje nivoa ROS u grupi ćelija koje su izlagane najmanjoj koncentraciji DBP, i to za 22,3% u odnosu na kontrolu, dok je u grupi ćelija izlaganih 10^{-8} M DBP zapaženo povećanje nivoa ROS za 26,3% u odnosu na kontrolu. Nakon devet nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP nije zapažen značajan efekat na stvaranje ROS. Sa druge strane, nakon dvanaest nedelja izlaganja ćelija 10^{-9} M i 10^{-7} M DBP, zapaženo je smanjenje nivoa ROS, i to za 12,2% i ~21% u odnosu na kontrolu, redom (slika 4.3.8).



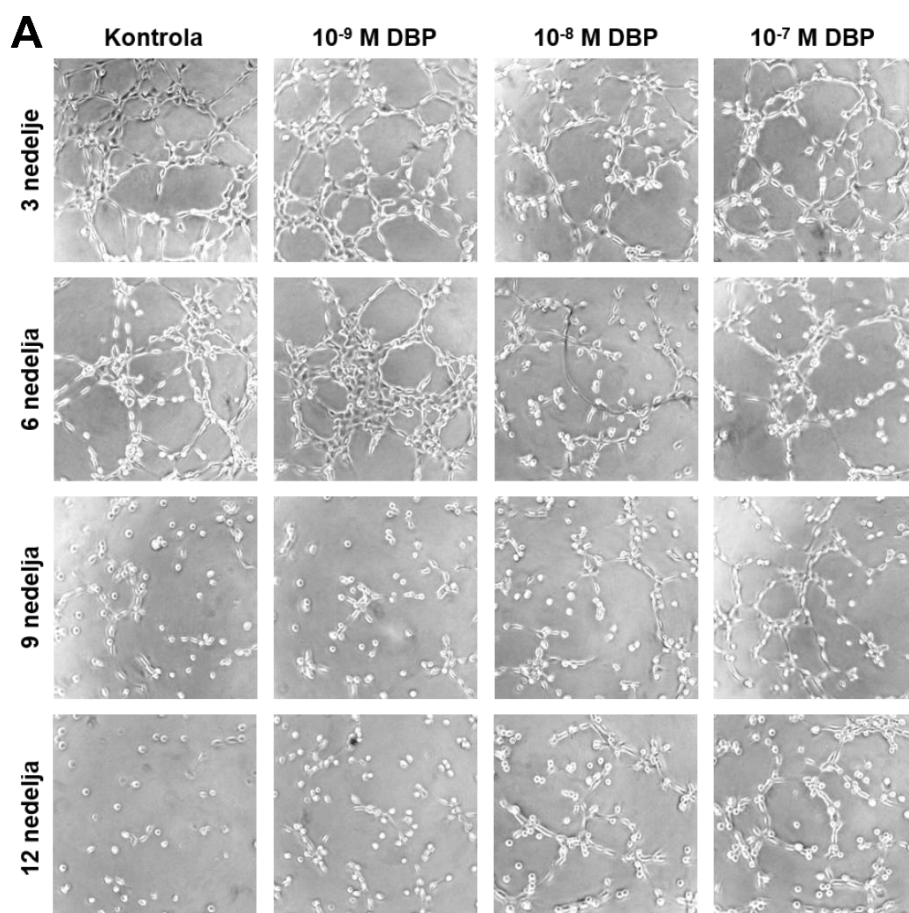
Slika 4.3.8. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na nivo reaktivnih vrsta kiseonika. Nakon tri, šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na nivo ROS korišćenjem reagensa H_2DCFDA . Dobijene vrednosti su izražene kao procenat nivoa ROS u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

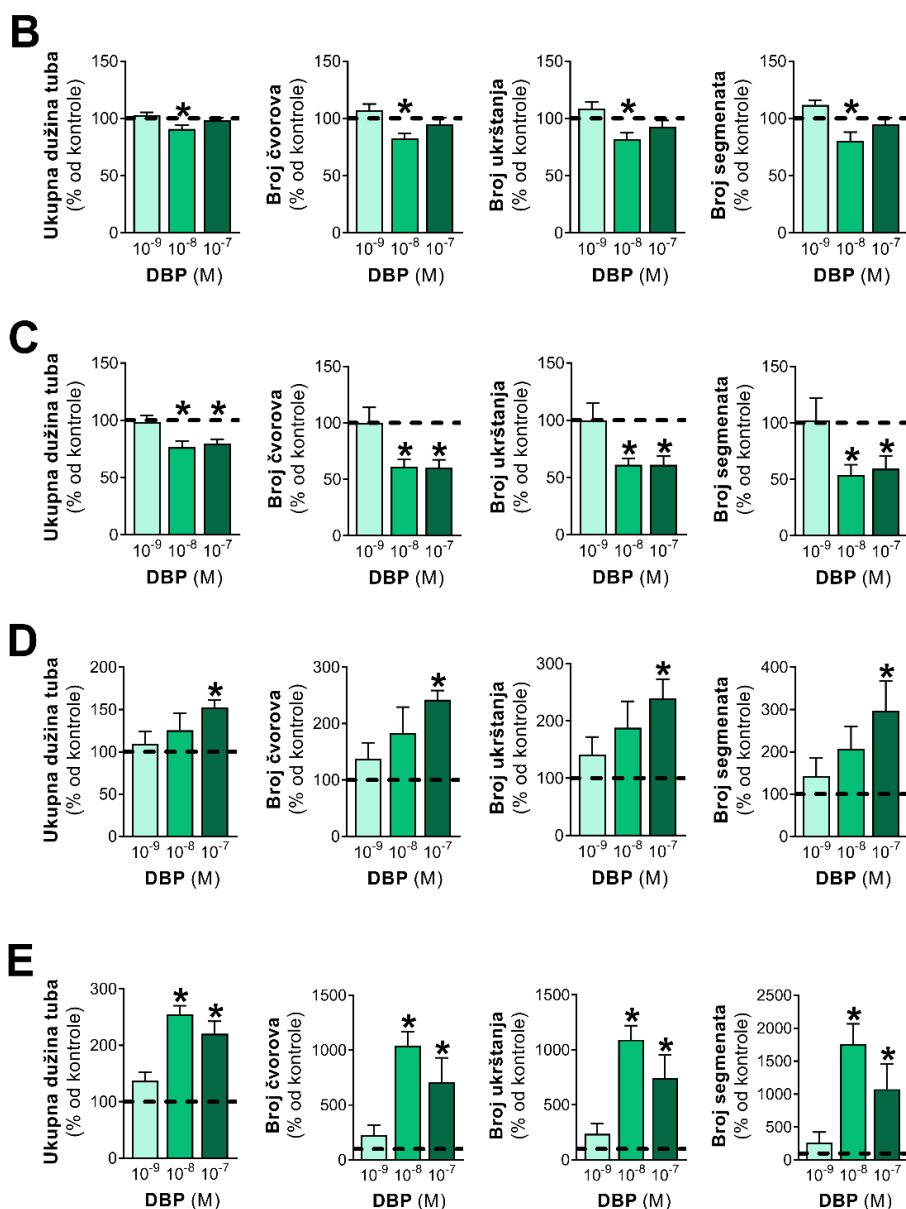
4.3.9. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na angiogenezu u uslovima *in vitro*

Uticaj dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP na angiogenezu u uslovima *in vitro* je ispitan testom formiranja endotelnih tuba. Morfometrijska analiza je urađena pomoću alata Angiogenesis Analyzer u okviru programa Image J koji omogućava dobijanje kvantitativnih podataka za veći broj parametara angiogeneze. Za potrebe statističke analize je odabrano šest najrelevantnijih parametara, uključujući ukupnu dužinu tuba, broj čvorova, broj ukrštanja, broj segmenata, ukupnu dužinu segmenata i ukupnu dužina račvanja. Uopšteno posmatrano, analiza navedenih parametara je pokazala da je formiranje endotelnih tuba smanjeno nakon tri i šest nedelja, dok je nakon devet i dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP detektovano povećano formiranje endotelnih tuba.

Detaljnije, nakon tri nedelje izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP, svi analizirani parametri angiogeneze su bili smanjeni samo u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-8} M DBP, i to ukupna dužina tuba za 9,3% u odnosu na kontrolu, broj čvorova (eng. *nodes*) za 17,6%, broj ukrštanja (eng. *junctions*) za 17,8% i broj segmenata za 19,8% (slika 4.3.9A i B). Pored toga, detektovana je za 15,3% manja ukupna dužina segmenata i za 11,6% manja ukupna dužina račvanja u odnosu na kontrolu (rezultati nisu prikazani na slici). Nakon šest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP, svi analizirani parametri angiogeneze su bili smanjeni kod ćelija izlaganih 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP. U grupi ćelija koje su tokom šest nedelja izlagane 10^{-8} M DBP ukupna dužina tuba je smanjena za 23,5%, broj čvorova za 38,7%, broj ukrštanja za 38,7%, a broj segmenata za 46,1% u odnosu na kontrolu. U grupi ćelija koje su tokom šest nedelja izlagane 10^{-7} M DBP dobijene su slične vrednosti, pa je tako ukupna dužina tuba smanjena za 20,3%, broj čvorova za 39,5%, broj ukrštanja za 38,8%, a broj segmenata za 40,7% u odnosu na kontrolu (slika 4.3.9A i C). Pored toga, u grupi ćelija izlaganih 10^{-8} M DBP detektovana je za 43,8% manja ukupna dužina segmenata i za 30,2% manja ukupna dužina račvanja u odnosu na kontrolu, dok je u grupi ćelija izlaganih 10^{-7} M DBP detektovana za 25% manja ukupna dužina račvanja, dok ukupna dužina segmenata nije statistički značajno odstupala u odnosu na kontrolu (rezultati nisu prikazani na slici). Sa druge strane, nakon devet nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP su svi analizirani parametri angiogeneze bili povećani u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-7} M DBP, i to ukupna dužina tuba za 52,8% u odnosu na kontrolu, broj čvorova za 142,3%, broj ukrštanja za 139,2% i broj segmenata za 196,5% (slika 4.3.9A i D). Pored toga, detektovana je za 224,2% veća ukupna dužina segmenata i za 116,7% veća ukupna dužina račvanja

(rezultati nisu prikazani na slici). Nakon dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP, svi analizirani parametri angiogeneze su bili povećani kod ćelija koje su izlagane 10^{-8} M DBP i 10^{-7} M DBP. U grupi ćelija koje su tokom dvanaest nedelja izlagane 10^{-8} M DBP ukupna dužina tuba je povećana za 154,7%, broj čvorova za ~900%, broj ukrštanja za ~994%, a broj segmenata za ~1660% u odnosu na kontrolu. U grupi ćelija koje su tokom dvanaest nedelja izlagane 10^{-7} M DBP dobijene su slične vrednosti, pa je tako ukupna dužina tuba povećana za 120,8%, broj čvorova za 610%, broj ukrštanja za ~645%, a broj segmenata za 975% u odnosu na kontrolu (slika 4.3.9A i E). Pored toga, u grupi ćelija izlaganih 10^{-8} DBP detektovana je za ~2070% veća ukupna dužina segmenata i za 870% veća ukupna dužina račvanja u odnosu na kontrolu, dok je u grupi ćelija izlaganih 10^{-7} M DBP detektovana za ~1125% veća ukupna dužina segmenata i za ~575% veća ukupna dužina račvanja u odnosu na kontrolu (rezultati nisu prikazani na slici).



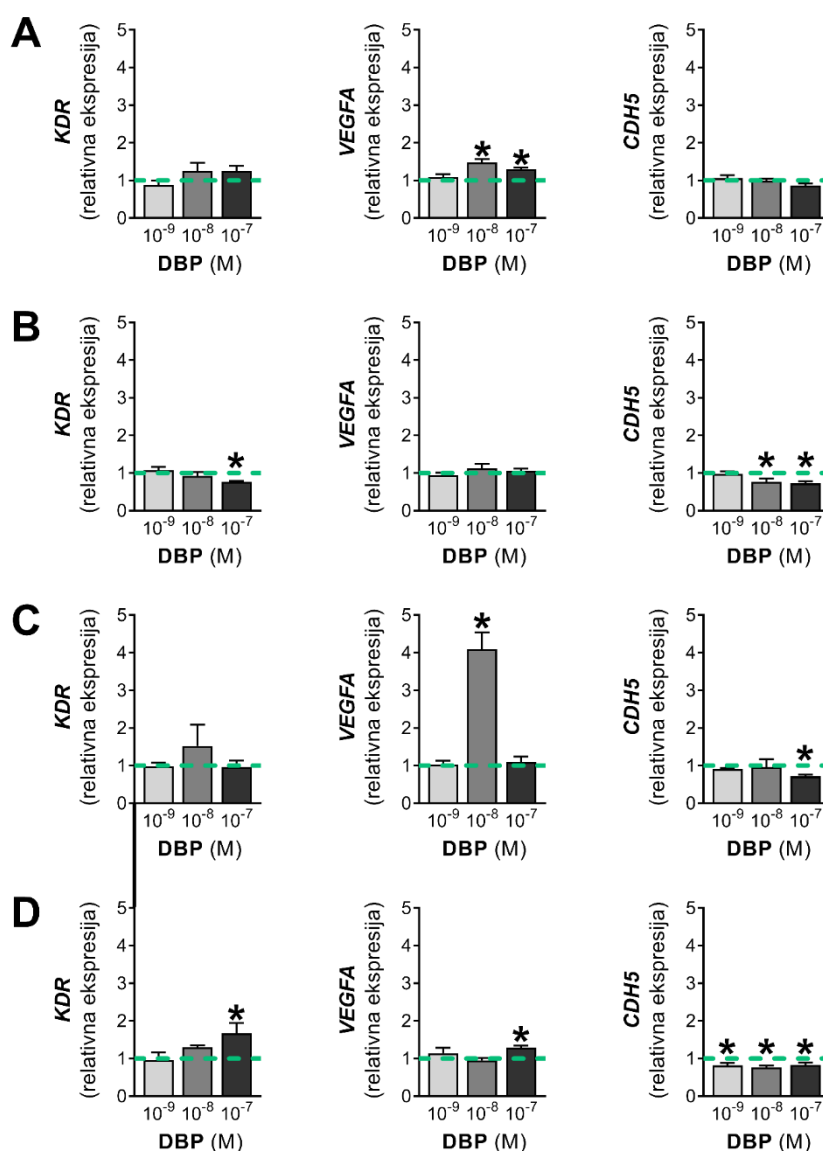


Slika 4.3.9. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na angiogenezu u uslovima *in vitro*. (A) Prikazane su reprezentativne fotomikrografije. Nakon (B) tri, (C) šest, (D) devet i (E) dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na formiranje endotelnih tuba u uslovima *in vitro* korišćenjem trodimenzionalnog matriksa Cultrex BME. Formiranje endotelnih tuba je posmatrano pod svetlosnim mikroskopom nakon 8 h. Kvantitativna analiza je urađena korišćenjem alata Angiogenesis Analyzer iz programa Image J. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat odgovarajućeg parametra angiogeneze u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.3.10. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za odabrane proteine uključene u kontrolu angiogeneze

S obzirom na to da su prethodni rezultati pokazali razlike u sposobnosti EA.hy926 ćelija da formiraju endotelne tube u različitim nedeljama izlaganja ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP, u sledećem koraku je metodom RT-qPCR određivana relativna ekspresija gena za odabrane proteine uključene u kontrolu angiogeneze: receptor za vaskularni endotelni faktor rasta 2 (VEGFR-2,

kodiran genom *KDR*), vaskularni endotelni faktor rasta A (VEGF-A, kodiran genom *VEGFA*) i vaskularni endotelni kadherin (VE-kadherin, kodiran genom *CDH5*). Rezultati su pokazali da je nakon tronedeljnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP povećana relativna ekspresija gena koji kodira VEGF-A za 47,2% u grupi ćelija izlaganih 10^{-8} M DBP i 30,5% u grupi ćelija izlaganih 10^{-7} M DBP, dok nisu uočene značajne razlike u relativnoj ekspresiji gena za VEGFR-2 i VE-kadherin (slika 4.3.10A). Nakon šest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP, detektovana je smanjena ekspresija gena za VEGFR-2 u grupi ćelija izlaganih 10^{-7} M DBP za ~24% u odnosu na kontrolu, kao i za VE-kadherin u grupi ćelija izlaganih 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP, i to za ~24% i ~28% u odnosu na kontrolu, redom (slika 4.3.10B).

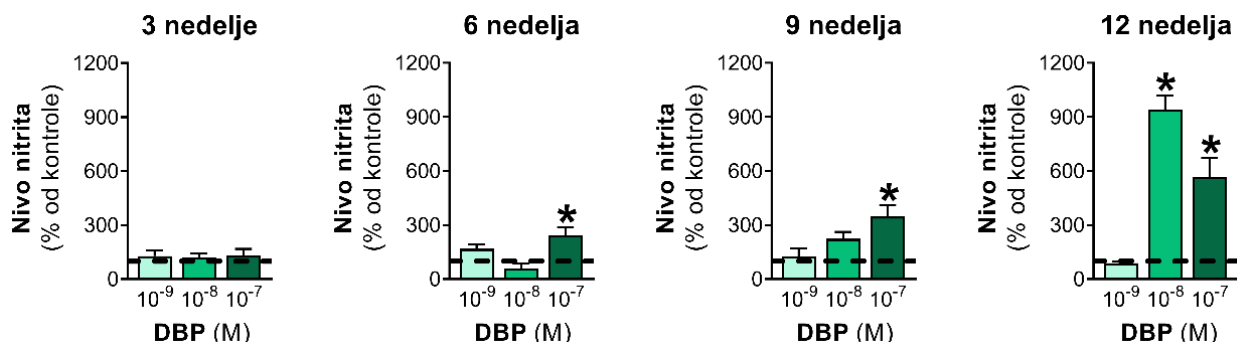


Slika 4.3.10. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na ekspresiju gena za odabrane proteine uključene u kontrolu angiogeneze. Nakon (A) tri, (B) šest, (C) devet i (D) dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju gena za VEGFR-2 (*KDR*), VEGF-A (*VEGFA*) i VE-kadherin (*CDH5*) korišćenjem metode RT-qPCR. Dobijene vrednosti su izražene kao relativna ekspresija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

Nakon devet nedelja je zapažena povećana relativna ekspresija gena koji kodira VEGF-A za 310% u odnosu na kontrolu u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-8} M DBP, dok je istovremeno zapažena smanjena ekspresija gena za VE-kadherin za ~29% u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-7} M DBP (slika 4.3.10C). Nakon dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP, detektovana je povećana relativna ekspresija gena za VEGFR-2 i VEGF-A samo sa najvećom koncentracijom DBP, i to za 66,8% i 29% u odnosu na kontrolu, redom, a smanjena ekspresija gena koji kodira VE-kadherin sa svim ispitivanim koncentracijama DBP: za ~18% u odnosu na kontrolu u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-9} M DBP, za ~23% u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-8} M DBP i za ~17% u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-7} M DBP (slika 4.3.10D).

4.3.11. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na stvaranje azot-monoksida

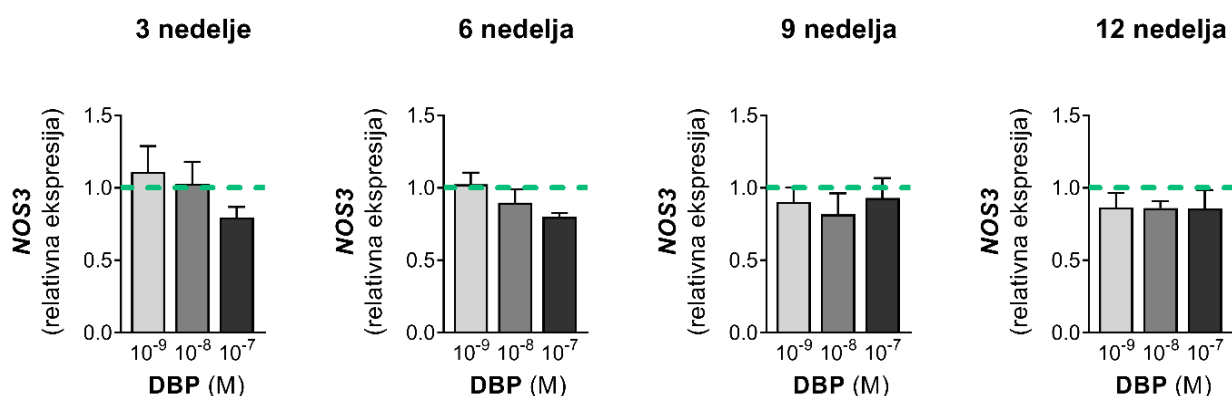
U daljem koraku je metodom po Griess-u određivana koncentracija nitrita u medijumu EA.hy926 ćelija koje su dugotrajno izlagane 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP tokom dvanaest nedelja. Rezultati su pokazali da nakon tri nedelje nije bilo razlika u koncentraciji nitrita u odnosu na kontrolu ni sa jednom od korišćenih koncentracija DBP. Nakon šest i devet nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP, uočeno je postepeno povećanje koncentracije nitrita u medijumu samo sa najvećom koncentracijom DBP, i to za 143,6% i ~248% u odnosu na kontrolu, redom, dok je nakon dvanaest nedelja izlaganja značajan porast nivoa nitrita zapažen u grupi ćelija izlaganih 10^{-8} M DBP (~841% u odnosu na kontrolu) i u grupi ćelija izlaganih 10^{-7} M DBP (~468% u odnosu na kontrolu) (slika 4.3.11).



Slika 4.3.11. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na stvaranje azot-monoksida. Nakon tri, šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), posredno je ispitan uticaj tretmana na stvaranje NO preko merenja koncentracije nitrita u medijumu metodom po Griess-u. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat nivoa nitrita u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.3.12. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za eNOS

Metodom RT-qPCR je u svetlu prethodno dobijenih rezultata ispitano da li dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP utiče na relativnu ekspresiju gena za eNOS. Rezultati su pokazali da nakon tri, šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP nije bilo značajnih razlika u ekspresiji gena za eNOS u odnosu na kontrolu (slika 4.3.12).

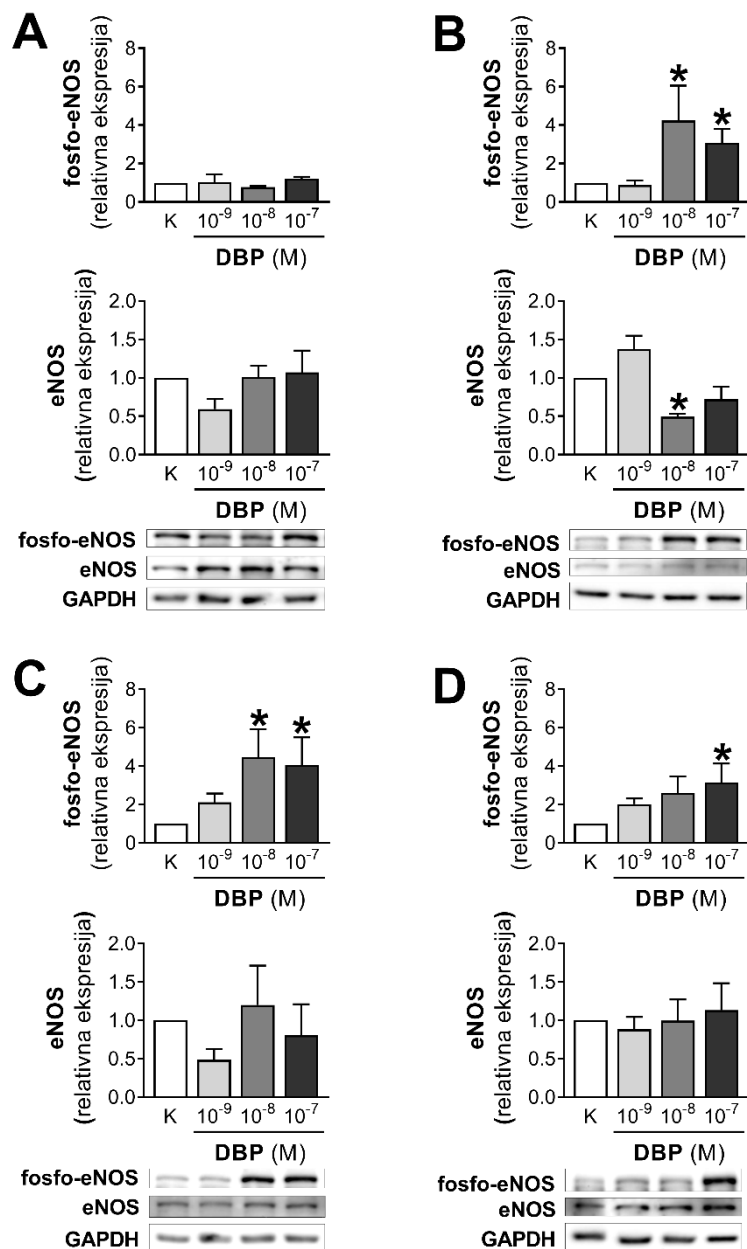


Slika 4.3.12. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za eNOS. Nakon tri, šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju gena za eNOS (*NOS3*) korišćenjem metode RT-qPCR. Dobijene vrednosti su izražene kao relativna ekspresija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.3.13. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na ekspresiju i aktivaciju eNOS

S obzirom na to da su prethodni rezultati pokazali razlike u sposobnosti EA.hy926 ćelija da stvaraju NO u različitim nedeljama izlaganja ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP, a da istovremeno nisu detektovane razlike u relativnoj ekspresiji gena za eNOS, enzima odgovornog za sintezu NO u endotelnim ćelijama, u sledećem koraku su metodom Western blot određivani ekspresija ukupne i fosforilisane forme eNOS (praćenjem aktivacione fosforilacije na Ser1177). Uopšteno posmatrano, uglavnom nisu uočene značajne razlike u ekspresiji eNOS u različitim nedeljama izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP, dok je ekspresija fosforilisane forme eNOS tokom nedelja uglavnom pratila trend povećanja koncentracije nitrita u medijumu.

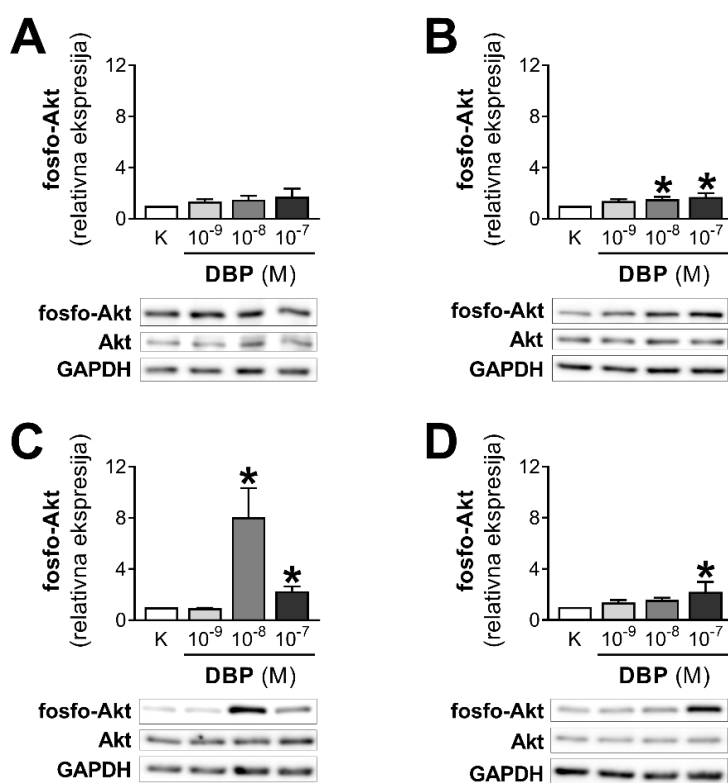
Detaljnije, rezultati su pokazali da nakon tri nedelje izlaganja ćelija svim odabranim koncentracijama DBP nije bilo razlika u ekspresiji aktivirane tj. fosforilisane forme eNOS (slika 4.3.13A). Detektovano je značajno povećanje ekspresije fosfo-eNOS u grupi EA.hy926 ćelija izlaganih 10^{-8} M DBP i 10^{-7} M DBP, i to za $\sim 324\%$ i $\sim 209\%$ u odnosu na kontrolu, redom, dok je samo nakon šest nedelja izlaganja ćelija 10^{-8} M DBP zapaženo smanjenje ekspresije eNOS za $\sim 50\%$ u odnosu na kontrolu (slika 4.3.13B). Nakon devet nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP, zapažen je sličan trend povećanja ekspresije fosfo-eNOS, za $\sim 346\%$ i 326% , redom (slika 4.3.13C), dok je nakon dvanaest nedelja samo najveća koncentracija DBP dovela do povećanja ekspresije fosforilisane forme eNOS od oko 215% u odnosu na kontrolu (slika 4.3.13D).



Slika 4.3.13. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na ekspresiju i aktivaciju eNOS. Nakon (A) tri, (B) šest, (C) devet i (D) dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M i 10⁻⁷ M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju ukupne i fosforilisane forme (Ser1177) eNOS metodom Western blot. Prikazane su reprezentativne Western blot slike. Kvantifikacija je urađena korišćenjem programa Image J. Za prikazivanje ekspresije eNOS, dobijene vrednosti za svaki uzorak su normalizovane na nivo proteina GAPDH u datom uzorku, a rezultati su izraženi relativno u odnosu na normalizovani nivo proteina eNOS u kontroli (1). Za prikazivanje ekspresije fosforilisane forme eNOS, dobijene vrednosti za svaki uzorak su normalizovane na nivo nefosforilisane forme eNOS u datom uzorku, a rezultati su izraženi relativno u odnosu na normalizovani nivo fosfo-eNOS u kontroli (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 nezavisna ćelijska flaska. **p*<0,05 statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.3.14. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na aktivaciju Akt

Metodom Western blot je ispitano da li dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP utiče na fosforilaciju Akt (praćenjem aktivacione fosforilacije na Ser473), odnosno aktivaciju signalnog puta PI3K/Akt. Uopšteno posmatrano, rezultati su pokazali sličan trend kao prethodno prikazani rezultati o fosforilaciji eNOS. Naime, nakon tri nedelje izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP nije bilo razlika u ekspresiji fosfo-Akt (slika 4.3.14A), dok je nakon šest i devet nedelja detektovano značajno povećanje ekspresije aktivirane forme Akt u grupi ćelija izlaganih 10^{-8} M DBP i 10^{-7} M DBP: nakon šest nedelja za ~53% i ~70% u odnosu na kontrolu, redom (slika 4.3.14B), a nakon devet nedelja za ~706% i 127% u odnosu na kontrolu, redom (slika 4.3.14C). Nakon dvanaestonedeljnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP uočeno je povećanje ekspresije fosforilisane forme Akt od ~131% u odnosu na kontrolu samo sa najvećom koncentracijom DBP (slika 4.3.14D).

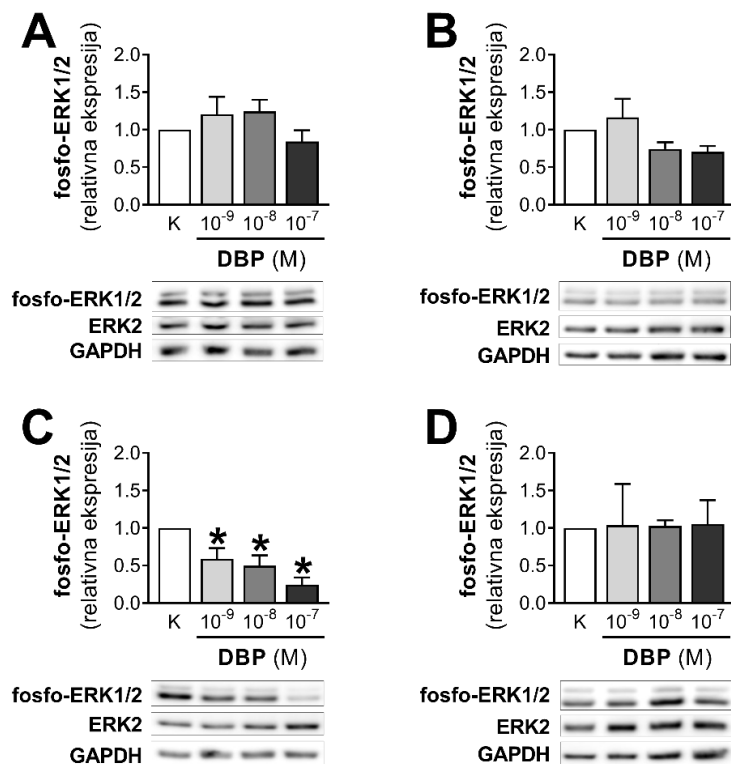


Slika 4.3.14. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na aktivaciju Akt. Nakon (A) tri, (B) šest, (C) devet i (D) dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitano je uticaj tretmana na ekspresiju fosforilisane forme Akt (Ser473) metodom Western blot. Prikazane su reprezentativne Western blot slike. Kvantifikacija je urađena korišćenjem programa Image J. Dobijene vrednosti za svaki uzorak su normalizovane na nivo nefosforilisane forme Akt u datom uzorku, a rezultati su izraženi relativno u odnosu na normalizovani nivo fosfo-Akt u kontroli (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.3.15. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na aktivaciju ERK1/2

Nadalje je ispitano da li dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M DBP utiče na fosforilaciju ERK1/2 (praćenjem aktivacione fosforilacije na Thr202/Tyr204), odnosno aktivaciju MAPK signalnog puta. Rezultati su pokazali da nakon tri (slika 4.3.15A), šest (slika 4.3.15B) i dvanaest nedelja (slika 4.3.15D) dugotrajnog izlaganja ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP nije bilo razlika u aktivaciji ERK1/2 u odnosu na kontrolu ni sa jednom od

korišćenih koncentracija DBP, dok je samo nakon devet nedelja zapaženo smanjenje ekspresije fosfo-ERK1/2 u odnosu na kontrolu, i to za ~41% u odnosu na kontrolu u grupi ćelija koja su izlagane 10^{-9} M DBP, za ~50% u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-8} M DBP i za 75,5% u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-7} M DBP (slika 4.3.15C).

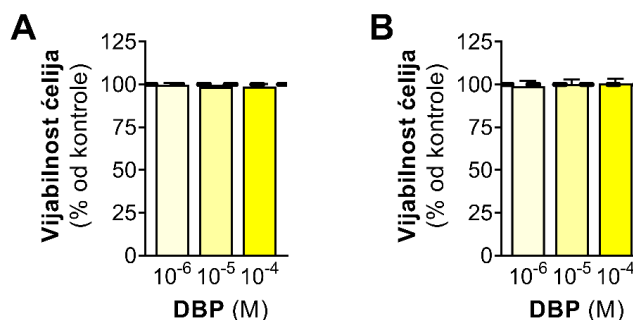


Slika 4.3.15. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na aktivaciju ERK1/2. Nakon (A) tri, (B) šest, (C) devet i (D) dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju fosforilisane forme ERK1/2 (Thr202/Tyr204) metodom Western blot. Prikazane su reprezentativne Western blot slike. Kvantifikacija je urađena korišćenjem programa Image J. Dobijene vrednosti za svaki uzorak su normalizovane na nivo nefosforilisane forme ERK2 u datom uzorku, a rezultati su izraženi relativno u odnosu na normalizovani nivo fosfo-ERK1/2 u kontroli (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna ćelijska flaska. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.4. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu

4.4.1. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na vijabilnost ćelija

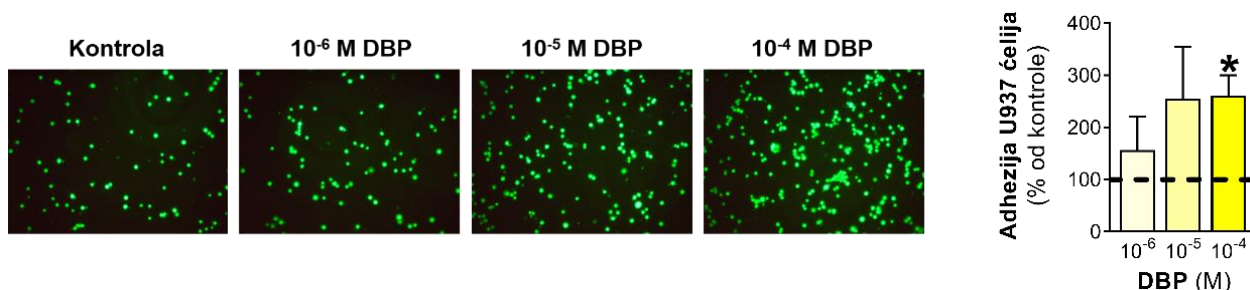
Uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP na metaboličku aktivnost/vijabilnost ćelija je ispitan testom sa bojom alamarBlue™. Analiza metaboličke aktivnosti je pokazala da odabrane mikromolarne koncentracije DBP ne dovode do značajnih promena u vijabilnosti EA.hy926 ćelija nakon 24 h i 48 h izlaganja (slika 4.4.1).



Slika 4.4.1. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na vijabilnost ćelija. Nakon (A) 24 h i (B) 48 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M), ispitan je uticaj tretmana na metaboličku aktivnost/vijabilnost ćelija korišćenjem testa sa bojom alamarBlue™. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat vijabilnosti u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 5 nezavisnih eksperimenata.

4.4.2. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija

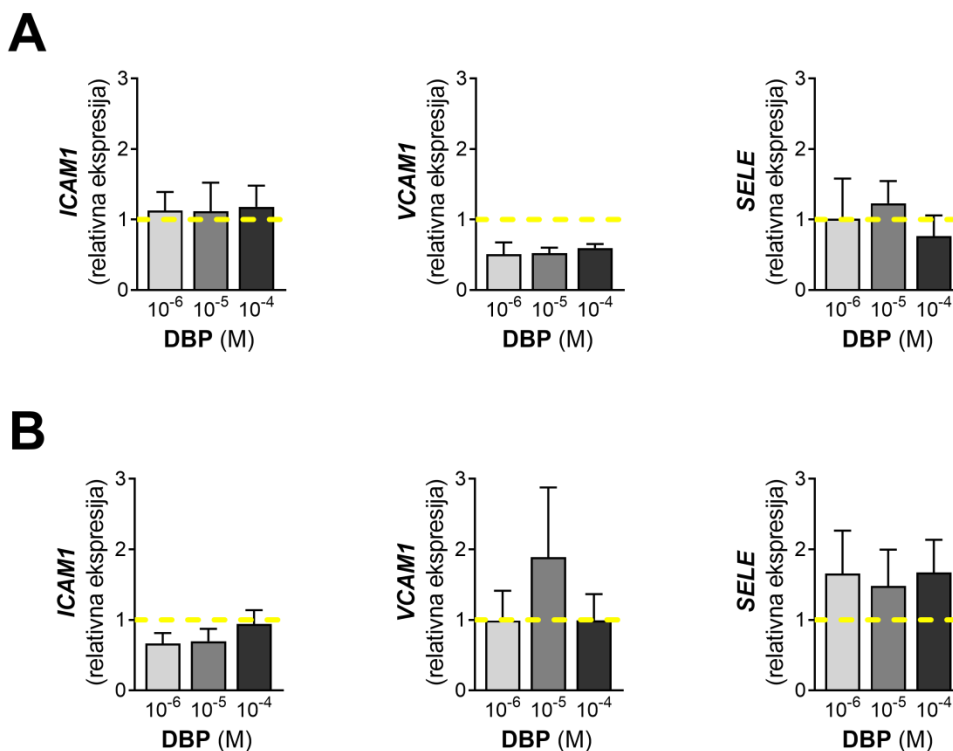
Metodom koja se zasniva na obeležavanju humanih monocita U937 fluorescentnom bojom kalcein AM, a potom praćenju vezivanja ovako pripremljenih monocita za jednosloj endotelnih ćelija u uslovima *in vitro* pomoću fluorescentnog mikroskopa ili fluorimetra ispitano je da li kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP utiče na sposobnost endotelnih ćelija da vezuju monocite. Pokazano je da je nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama DBP došlo do značajno povećanog vezivanja U937 ćelija za EA.hy926 ćelije koje su izlagane 10^{-4} M DBP, za 160,6% u odnosu na kontrolu, dok je ovaj efekat izostao sa drugim korišćenim koncentracijama DBP (slika 4.4.2).



Slika 4.4.2. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija. Nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M), ispitan je uticaj tretmana na vezivanje monocita za jednosloj EA.hy926 ćelija korišćenjem U937 ćelija obeleženih kalceinom AM. Prikazane su reprezentativne fluorescentne fotomikrografije. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat vezivanja U937 ćelija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.4.3. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule

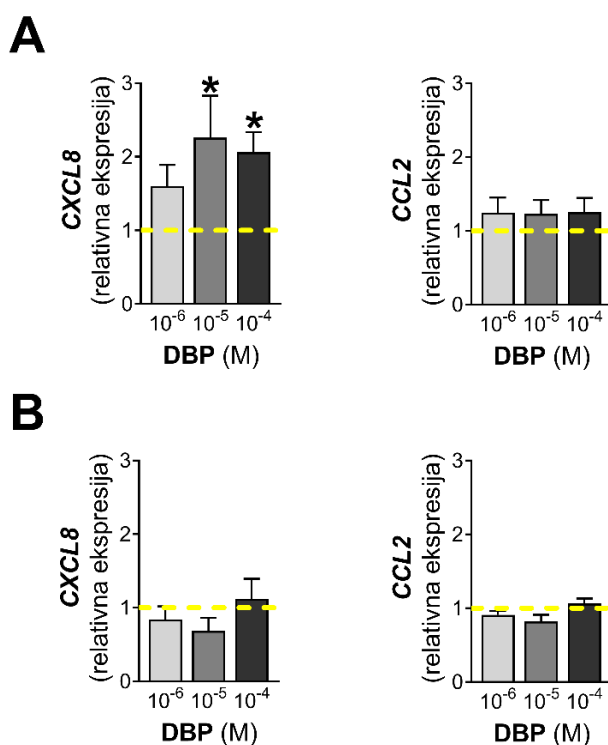
S obzirom na to da je prethodni rezultat pokazao povećano vezivanje U937 monocita za EA.hy926 ćelije koje su izlagane 10^{-4} M DBP u trajanju od 24 h, u sledećem koraku je određivana relativna ekspresija gena za odabrane CAM. Uopšteno posmatrano, rezultati određivanja relativne ekspresije gena za ICAM-1, VCAM-1 i E-selektin korišćenjem metode RT-qPCR nisu u saglasnosti sa prethodno prikazanim rezultatima o povećanom vezivanju U937 monocita za jednosloj EA.hy926 ćelija. Naime, nakon 6 h izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP relativna ekspresija gena koji kodiraju ICAM-1, VCAM-1 i E-selektin nije bila promenjena pod datim uslovima izlaganja (slika 4.4.3A). Nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija svim ispitivanim mikromolarnim koncentracijama DBP je efekat takođe izostao, odnosno nije bilo razlika u ekspresiji gena za ICAM-1, VCAM-1 i E-selektin u odnosu na kontrolu (slika 4.4.3B).



Slika 4.4.3. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule. Nakon (A) 6 h i (B) 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju gena za ICAM-1 (*ICAM1*), VCAM-1 (*VCAM1*) i E-selektin (*SELE*) korišćenjem metode RT-qPCR. Dobijene vrednosti su izražene kao relativna ekspresija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3–5 nezavisnih eksperimenata. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.4.4. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za IL-8 i MCP-1

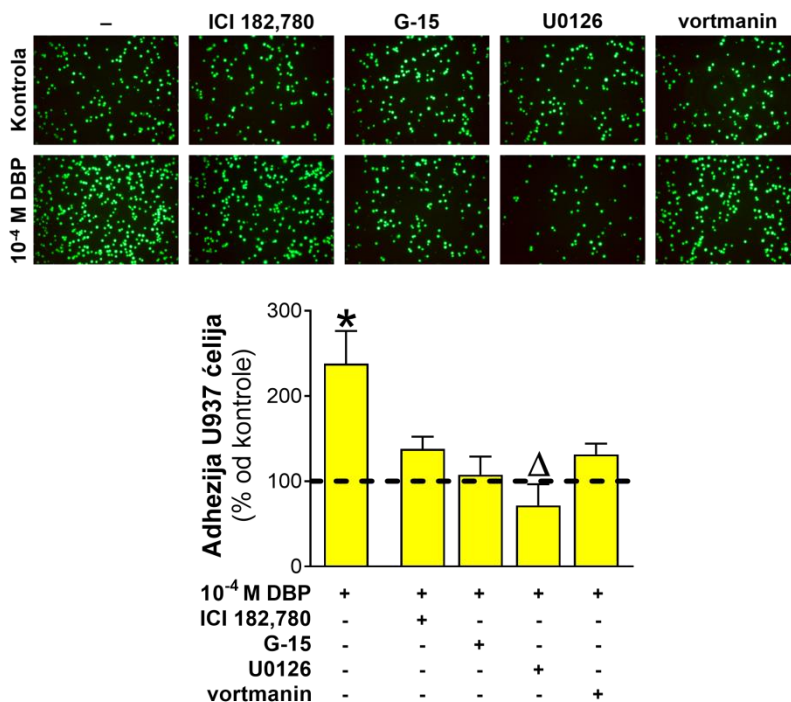
S obzirom na to da su prethodni rezultati pokazali da nije povećana relativna ekspresija gena za sva tri ispitivana CAM nakon izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP u trajanju od 6 h i 24 h, a uzimajući u obzir činjenicu da, pored CAM, i različiti hemokini imaju važnu ulogu u regrutovanju i vezivanju monocita za endotelne ćelije (Nourshargh i Alon, 2014), u sledećem koraku je korišćenjem metode RT-qPCR ispitano da li kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama DBP utiče na relativnu ekspresiju gena za dva hemokina: hemokinski ligand 8 sa motivom C-X-C (eng. *C-X-C motif chemokine ligand 8*, CXCL-8; kodiran genom *CXCL8*), koji se još naziva i IL-8, i hemokinski ligand 2 sa motivom C-C (eng. *C-C motif chemokine ligand 2*, CCL-2; kodiran genom *CCL2*), koji se još naziva i MCP-1. Rezultati su pokazali da je nakon 6 h izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP detektovana povećana ekspresija gena koji kodira IL-8 za 126% i 106% u odnosu na kontrolu, redom, dok je relativna ekspresija gena koji kodira MCP-1 pri istim uslovima izlaganja ostala nepromenjena (slika 4.4.4A). Sa druge strane, nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP nije bilo razlika u relativnoj ekspresiji gena za IL-8 i MCP-1 u odnosu na kontrolu ni sa jednom od korišćenih koncentracija DBP (slika 4.4.4B).



Slika 4.4.4. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za IL-8 i MCP-1. Nakon (A) 6 h i (B) 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju gena za IL-8 (*CXCL8*) i MCP-1 (*CCL2*) korišćenjem metode RT-qPCR. Dobijene vrednosti su izražene kao relativna ekspresija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3–5 nezavisnih eksperimenata. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.4.5. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija u prisustvu antagonista ER, GPER i inhibitora signalnih puteva ERK1/2 i PI3K/Akt

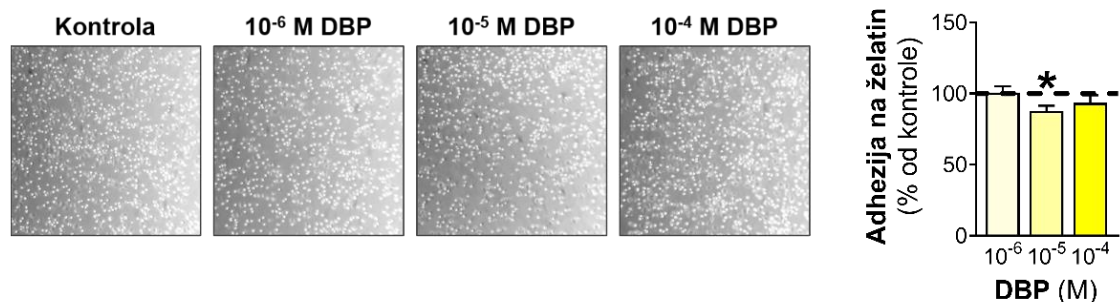
U cilju ispitivanja uloge ER i signalnih puteva ERK1/2 i PI3K/Akt u povećanom vezivanju U937 monocita za jednosloj EA.hy926 ćelija izlaganih 10^{-4} M DBP u trajanju od 24 h korišćeni su: ICI 182,780 – antagonist klasičnog ER, G-15 – antagonist GPER, U0126 – inhibitor ERK1/2 i vortmanin – inhibitor PI3K/Akt. Rezultati su pokazali da je primena U0126 u potpunosti poništila efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-4} M DBP na vezivanje monocita za jednosloj endotelnih ćelija u uslovima *in vitro*, dok efekat ICI 182,780, G-15 i vortmanina nije dostigao nivo statističke značajnosti (slika 4.4.5).



Slika 4.4.5. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na vezivanje U937 ćelija za jednosloj endotelnih ćelija u prisustvu antagonista ER, GPER i inhibitora signalnih puteva ERK1/2 i PI3K/Akt. EA.hy926 ćelije su 45 min pretretirane: ICI 182,780 (5 μ M), G-15 (5 μ M), U0126 (5 μ M) i vortmaninom (1 μ M), a zatim izlagane i 10^{-4} M DBP. Nakon 24 h izlaganja, ispitan je uticaj tretmana i antagonista/inhibitora na vezivanje monocita za jednosloj EA.hy926 ćelija korišćenjem U937 ćelija obeleženih kalceinom AM. Prikazane su reprezentativne fluorescentne fotomikrografije. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat vezivanja U937 ćelija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; $\Delta p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na 10^{-4} M DBP.

4.4.6. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na adheziju ćelija za želatin

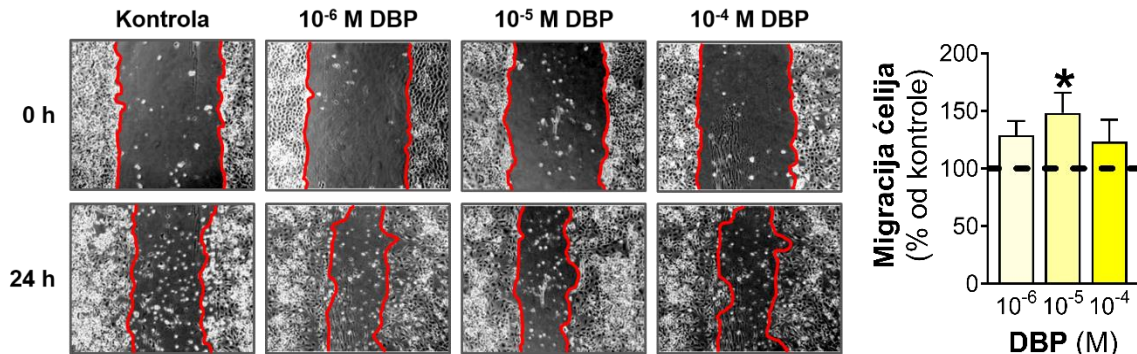
U sledećem koraku je ispitan uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP na adheziju ćelija za želatin. Utvrđeno je da je vezivanje ćelija za želatin smanjeno za ~13% u odnosu na kontrolu nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-5} M DBP, dok su ostale ispitivane koncentracije DBP bile bez efekta (slika 4.4.6).



Slika 4.4.6. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na adheziju ćelija za želatin. Nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M), ispitan je uticaj tretmana na vezivanje ćelija za želatin. Prikazane su reprezentativne fotomikrografije. Broj vezanih ćelija određen je testom sa bojom SRB. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat adhezije za želatin u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.4.7. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na migraciju ćelija

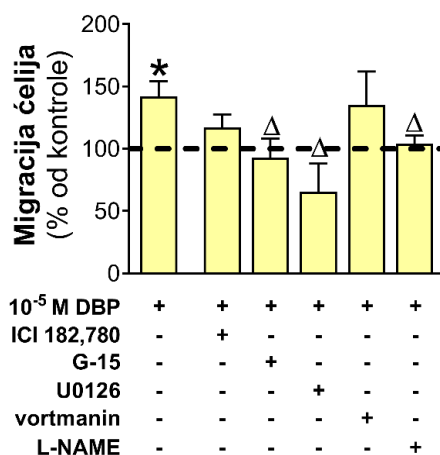
Testom „zarastanja povrede” je zatim ispitano da li kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP u trajanju od 24 h utiče na migraciju endotelnih ćelija. Rezultati su pokazali povećanje migracije za 48,4% u odnosu na kontrolu samo u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-5} M DBP, dok ostale ispitivane koncentracije DBP nisu dostigle nivo statističke značajnosti (slika 4.4.7).



Slika 4.4.7. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na migraciju ćelija. Nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M), ispitan je uticaj tretmana na migraciju ćelija korišćenjem metode „zarastanja povrede“. Prikazane su reprezentativne fotomikrografije u trenutku pravljenja povrede (0 h) i nakon što su ćelije migrirale (24 h). Migracija je kvantifikovana korišćenjem programa Image J kao srednja vrednost 8–10 izmerenih rastojanja između ivica ćelija sa obe strane u trenutku pravljenja povrede i nakon što su ćelije migrirale. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat zatvaranja povrede u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 7 nezavisnih eksperimenata. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.4.8. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na migraciju ćelija u prisustvu antagonista ER, GPER i inhibitora signalnih puteva ERK1/2, PI3K/Akt i eNOS-NO

U cilju ispitivanja uloge ER i nishodnih signalnih puteva ERK1/2, PI3K/Akt i eNOS-NO u povećanoj migraciji EA.hy926 ćelija koje su izlagane 10^{-5} M DBP u trajanju od 24 h, korišćeni su: ICI 182,780, G-15, U0126, vortmanin i L-NAME – inhibitor signalnog puta eNOS-NO. Rezultati su pokazali da je primena G-15, U0126 i L-NAME u potpunosti poništila efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-5} M DBP na migraciju endotelnih ćelija, dok efekat ICI 182,780 i vortmanina nije dostigao nivo statističke značajnosti (slika 4.4.8).



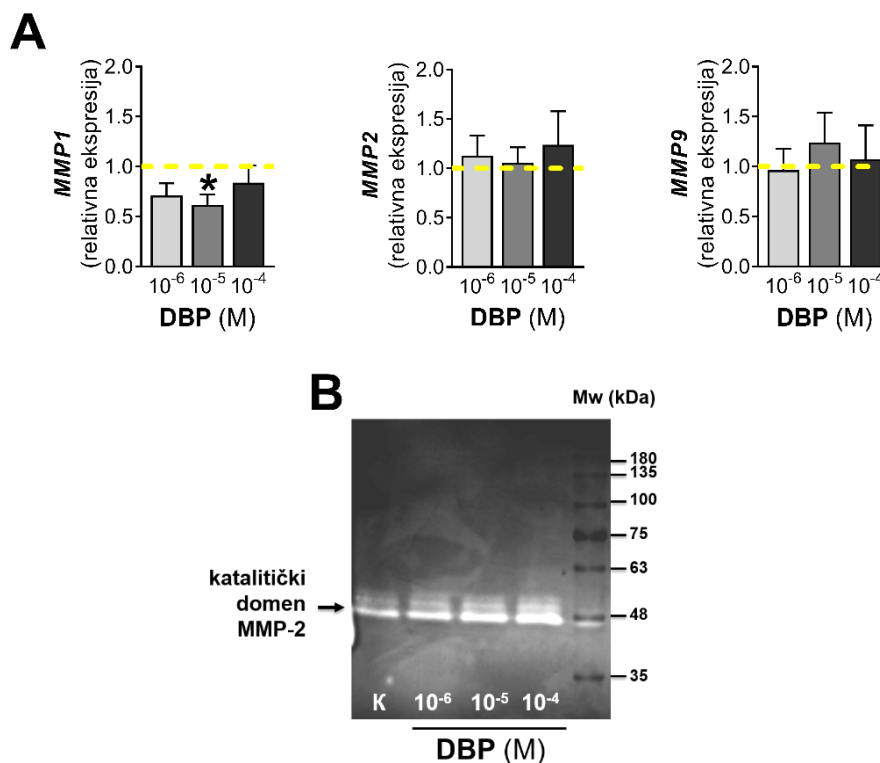
Slika 4.4.8. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na migraciju ćelija u prisustvu antagonista ER, GPER i inhibitora signalnih puteva ERK1/2, PI3K/Akt i eNOS-NO. EA.hy926 ćelije su 45 min pretretirane: ICI 182,780 (10 μ M), G-15 (5 μ M), U0126 (5 μ M), vortmaninom (1 μ M) i L-NAME (100 μ M), a zatim izlagane i 10^{-5} M DBP. Nakon 24 h izlaganja, ispitan je uticaj pretretmana i tretmana na migraciju ćelija korišćenjem metode „zarastanja povrede“. Migracija je kvantifikovana korišćenjem programa Image J kao srednja vrednost 8–10 izmerenih rastojanja između ivica ćelija sa obe strane u trenutku pravljenja povrede (0 h) i nakon što su ćelije migrirale (posle 24 h). Dobijene vrednosti su izražene kao procenat zatvaranja povrede u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3–6 nezavisnih eksperimenata. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; $\Delta p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na 10^{-5} M DBP.

4.4.9. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za matriksne metaloproteinaze i aktivnost matriksnih metaloproteinaza

U cilju utvrđivanja da li kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-5} M DBP u trajanju od 24 h povećava migraciju endotelnih ćelija preko povećane ekspresije ili aktivacije MMP, prvo je ispitan uticaj navedenog izlaganja i tretmana na relativnu ekspresiju gena za tri matriksne metaloproteinaze: MMP-1, MMP-2 i MMP-9. Rezultati dobijeni metodom RT-qPCR su pokazali da izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP u trajanju od 24 h ne utiče značajno na ekspresiju gena za MMP-2 i MMP-9, dok je ekspresija gena koji kodira MMP-1 smanjena za ~38% u odnosu na kontrolu samo u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-5} M DBP (slika 4.4.9A).

S obzirom na to da su prethodni rezultati pokazali da kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP ne utiče na relativnu ekspresiju gena za MMP-2 i MMP-9, u sledećem koraku je pomoću želatinske zimografije praćena aktivnost ovih proteolitičkih enzima na poliakrilamidnom gelu koji je kopolimerizovan sa želatinom. Rezultati dobijeni želatinskom zimografijom su pokazali da do razgradnje želatina dolazi samo od strane aktivirane MMP-2

detektovane pri molekularnoj masi od ~48 kDa, što odgovara katalitičkom domenu ovog enzima, dok se aktivna i latentna forma MMP-2 pri ~62 kDa i ~72 kDa, redom, kao i aktivna i latentna forma MMP-9 pri molekularnim masama od ~82 kDa i ~92 kDa, redom, nisu mogle detektovati na zimogramu (slika 4.4.9B). Na prikazanom zimogramu se uočava da se aktivnost MMP-2 nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP povećava se sa porastom koncentracije DBP, pa se tako najveća proteolitička aktivnost enzima MMP-2 zapaža u uzorcima medijuma dobijenim nakon izlaganja ćelija 10^{-5} M i 10^{-4} M BPA (slika 4.4.9B).

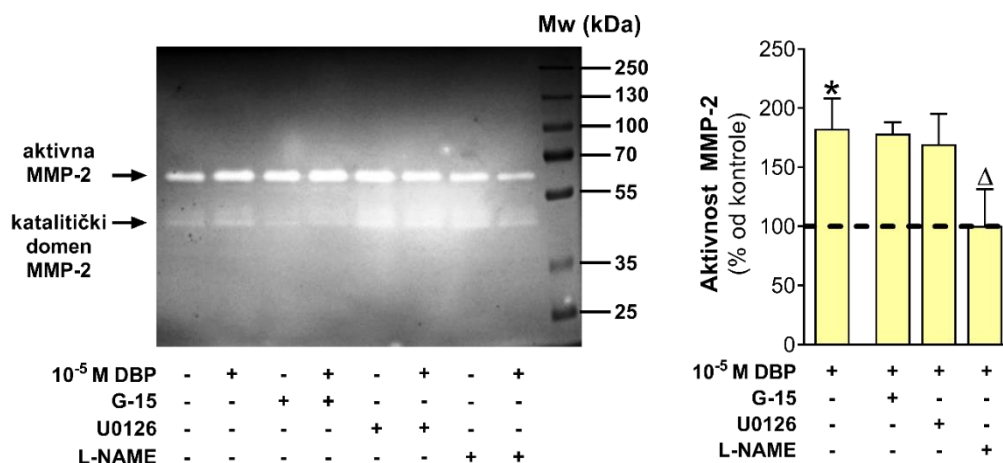


Slika 4.4.9. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za matriksne metaloproteinaze i aktivnost matriksnih metaloproteinaza. (A) Nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju gena za MMP-1 (*MMP1*), MMP-2 (*MMP2*) i MMP-9 (*MMP9*) korišćenjem metode RT-qPCR. Dobijene vrednosti su izražene kao relativna ekspresija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3–5 nezavisnih eksperimenata. (B) Nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M), ispitan je uticaj tretmana na aktivnost MMP u medijumu pomoću želatinske zimografije. Prikazana je reprezentativna fotografija zimograma. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.4.10. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na aktivnost matriksnih metaloproteinaza u prisustvu antagonista GPER i inhibitora signalnih puteva ERK1/2 i eNOS-NO

U svetlu prethodno dobijenih rezultata koji pokazuju ulogu GPER i signalnih puteva ERK1/2 i eNOS-NO u migraciji EA.hy926 ćelija izlaganih 10^{-5} M DBP u trajanju od 24 h, kao i ulogu aktiviranih MMP u procesu migracije, u sledećem koraku je ispitana uloga GPER i signalnih puteva ERK1/2 i eNOS-NO u aktivaciji MMP. S tim u vezi, metodom želatinske zimografije je određivana aktivnost MMP u uzorcima medijuma sakupljenim iz bunarića u kojima su EA.hy926 izlagane 10^{-5} M DBP u prisustvu: G-15, U0126 i L-NAME. Rezultati su pokazali da je proteolitička

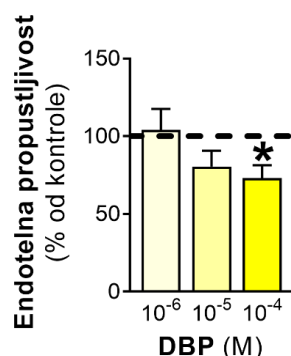
aktivnost MMP-2 u potpunosti smanjena samo u prisustvu L-NAME, dok je efekat antagonista GPER i inhibitora ERK1/2 izostao (slika 4.4.10).



Slika 4.4.10. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na aktivnost matriksnih metaloproteinaza u prisustvu antagonista GPER i inhibitora signalnih puteva ERK1/2 i eNOS-NO. EA.hy926 ćelije su 45 min pretretirane: G-15 (5 μ M), U0126 (5 μ M) i L-NAME (100 μ M), a zatim izlagane i 10⁻⁵ M DBP. Nakon 24 h izlaganja, ispitan je uticaj pretretmana i tretmana na aktivnost MMP u medijumu pomoću želatinske zimografije. Prikazana je reprezentativna fotografija zimograma. Kvantifikacija enzimske aktivnosti je urađena pomoću programa Image J. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat aktivnosti MMP-2 u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna eksperimenta. * p <0,05 statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; ^Δ p <0,05 statistički značajna razlika u odnosu na 10⁻⁵ M DBP.

4.4.11. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na propustljivost jednosloja endotelnih ćelija

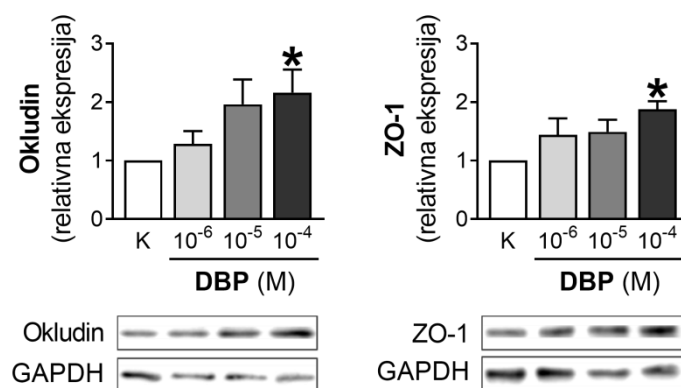
Korišćenjem Transwell sistema sa dva odeljka ispitano je da li kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M i 10⁻⁴ M DBP u trajanju od 24 h utiče na propustljivost konfluentnog jednosloja EA.hy926 ćelija. Rezultati su pokazali da kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10⁻⁴ M DBP smanjuje propustljivost jednosloja EA.hy926 ćelija za 27% u odnosu na kontrolu (slika 4.4.11).



Slika 4.4.11. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na endotelnu propustljivost. Nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M i 10⁻⁴ M), ispitan je uticaj tretmana na propustljivost jednosloja EA.hy926 ćelija korišćenjem dekstrana (Mw 40 kDa) obeleženog fluorescentnom bojom FITC u Transwell sistemu (veličina pora 0,4 μ m). Dobijene vrednosti su izražene kao procenat endotelne propustljivosti u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 5 nezavisnih eksperimenata. * p <0,05 statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.4.12. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na ekspresiju okludina i ZO-1

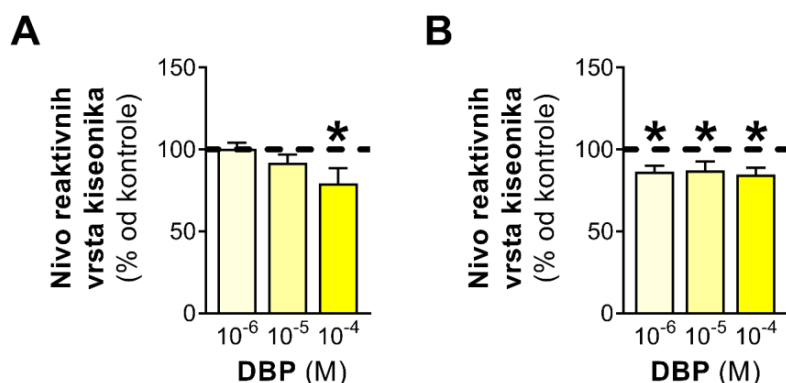
Uzimajući u obzir prethodno navedene rezultate vezane za smanjenu propustljivost jednosloja endotelnih ćelija pod uticajem DBP, u sledećem koraku je metodom Western blot ispitan uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP na ekspresiju okludina i ZO-1. Rezultati su pokazali da je nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-4} M DBP povećana ekspresija okludina za ~116% i ZO-1 za 87,5% u odnosu na kontrolu (slika 4.4.12).



Slika 4.4.12. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na ekspresiju okludina i ZO-1. Nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju okludina i ZO-1 metodom Western blot. Prikazane su reprezentativne Western blot slike. Kvantifikacija je urađena korišćenjem programa Image J. Dobijene vrednosti za svaki uzorak su normalizovane na nivo GAPDH u datom uzorku, a rezultati su izraženi relativno u odnosu na normalizovani nivo ispitivanog proteina u kontroli (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4-5 nezavisnih eksperimenata. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.4.13. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na nivo reaktivnih vrsta kiseonika

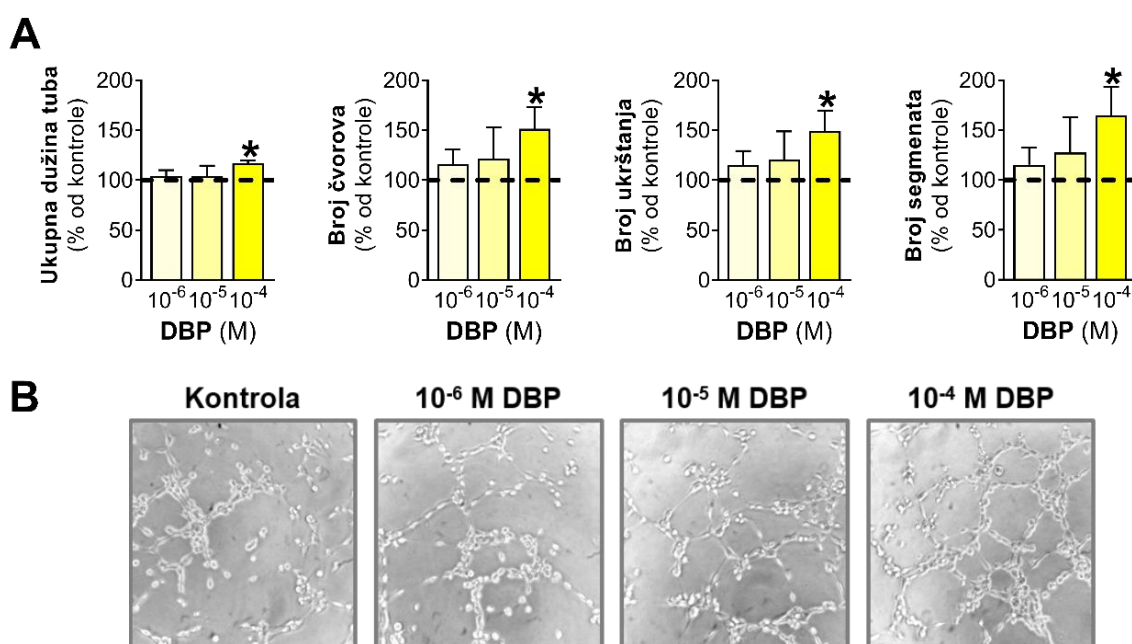
U sledećem koraku je pomoću reagensa H_2DCFDA određivan nivo ROS nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP. U cilju utvrđivanja da li izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama DBP utiče na stvaranje ROS, nivo ROS je određivan u dve vremenske tačke: nakon 30 min i nakon 24 h izlaganja. Rezultati su pokazali da kratko izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP u trajanju od 30 min smanjuje nivo ROS samo u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-4} M DBP, i to za ~20% u odnosu na kontrolu (slika 4.4.13A), dok duže izlaganje EA.hy926 ćelija u trajanju od 24 h smanjuje nivo ROS u svim ispitivanim grupama u odnosu na kontrolu, pa je tako uočeno smanjenje nivoa ROS od 13,4% u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-6} M DBP, 12,7% u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-5} M DBP i 15,3% u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-4} M DBP (slika 4.4.13B).



Slika 4.4.13. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na nivo reaktivnih vrsta kiseonika. Nakon (A) 30 min i (B) 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M), ispitan je uticaj tretmana na nivo ROS korišćenjem reagensa H_2DCFDA . Dobijene vrednosti su izražene kao procenat nivoa ROS u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4–5 nezavisnih eksperimenata. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.4.14. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na angienezu u uslovima *in vitro*

Uticaj izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP u trajanju od 24 h na angienezu u uslovima *in vitro* je ispitan testom formiranja endotelnih tuba.



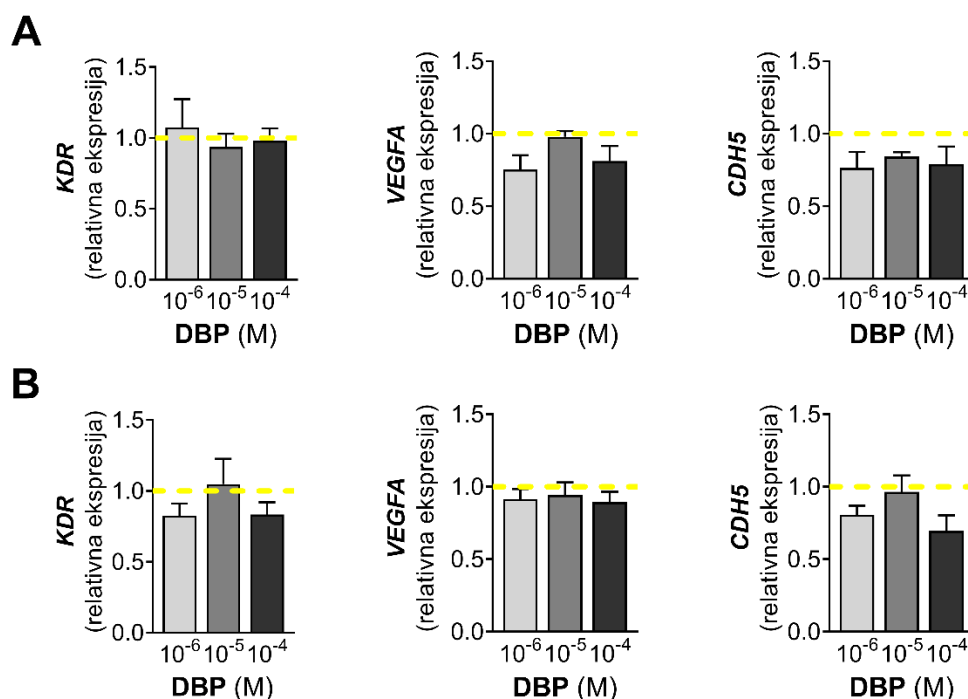
Slika 4.4.14. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na angienezu u uslovima *in vitro*. (A) Nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M), ispitan je uticaj tretmana na formiranje endotelnih tuba u uslovima *in vitro* korišćenjem trodimenzionalnog matriksa Cultrex BME. Formiranje endotelnih tuba je posmatrano pod svetlosnim mikroskopom nakon 8 h. (B) Prikazane su reprezentativne fotomikrografije. Kvantitativna analiza je urađena korišćenjem alata Angiogenesis Analyzer iz programa Image J. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat odgovarajućeg parametra angiogeneze u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3–5 nezavisnih eksperimenata. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

Sveobuhvatna morfometrijska analiza je urađena pomoću alata Angiogenesis Analyzer u okviru programa Image J, s tim što je za potrebe statističke analize odabrano šest najrelevantnijih parametara angiogeneze: ukupna dužina tuba, broj čvorova, broj ukrštanja, broj segmenata, ukupna dužina segmenata i ukupna dužina račvanja.

Svi analizirani parametri su bili povećani samo u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-4} M DBP, i to ukupna dužina tuba za 17,1% u odnosu na kontrolu, broj čvorova za 51%, broj ukrštanja za 49% i broj segmenata za 64,6% (slika 4.4.14A i B). Pored toga, sa najvećom koncentracijom DBP detektovana je i za 22,6% veća ukupna dužina račvanja u odnosu na kontrolu, dok ukupna dužina segmenata, iako za 27% veća, nije statistički značajno odstupala u odnosu na kontrolu (rezultati nisu prikazani na slici).

4.4.15. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za odabrane proteine uključene u kontrolu angiogeneze

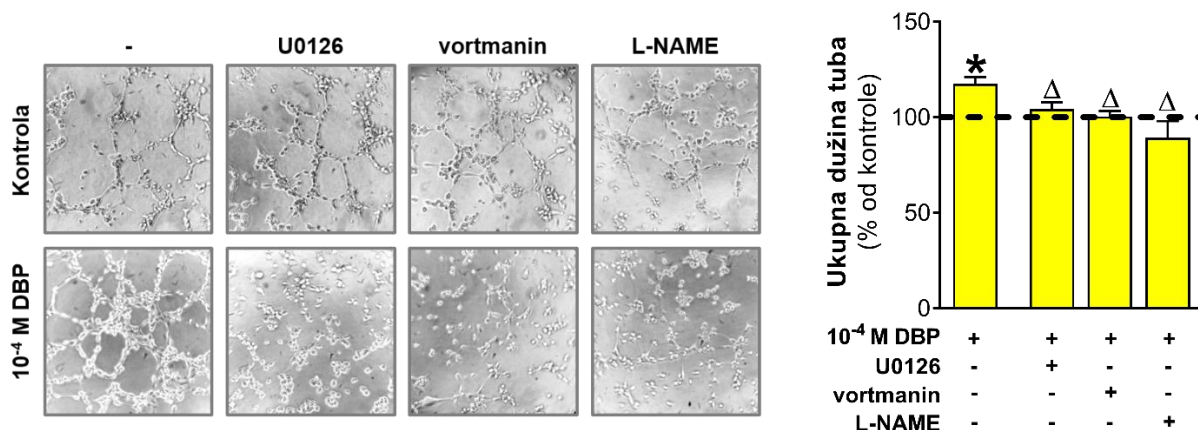
S obzirom na to da su prethodni rezultati pokazali da kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-4} M DBP stimuliše formiranje endotelnih tuba, u sledećem koraku je metodom RT-qPCR određivana relativna ekspresija gena za VEGFR-2, VEGF-A i VE-kadherin nakon 6 h i 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-6} , 10^{-5} i 10^{-4} M DBP. Rezultati su pokazali da nakon 6 h (slika 4.4.15A), kao ni nakon 24 h izlaganja (slika 4.4.15B) nije bilo značajnih razlika u ekspresiji gena koji kodiraju navedene proteine ni sa jednom od korišćenih koncentracija DBP.



Slika 4.4.15. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za odabrane proteine uključene u kontrolu angiogeneze. Nakon (A) 6 h i (B) 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju gena za VEGFR-2 (*KDR*), VEGF-A (*VEGFA*) i VE-kadherin (*CDH5*) korišćenjem metode RT-qPCR. Dobijene vrednosti su izražene kao relativna ekspresija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 3–4 nezavisna eksperimenta.

4.4.16. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na angiogenezu u uslovima *in vitro* u prisustvu inhibitora signalnih puteva ERK1/2, PI3K/Akt i eNOS-NO

U cilju ispitivanja uloge određenih signalnih puteva u povećanoj angiogenezi EA.hy926 ćelija koje su izlagane 10^{-4} M DBP u trajanju od 24 h, korišćeni su inhibitori signalnih puteva ERK1/2, PI3K/Akt i eNOS-NO: U0126, vortmanin i L-NAME, redom. Rezultati su pokazali da je primena sva tri inhibitora u potpunosti poništila efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-4} M DBP na formiranje endotelnih tuba (slika 4.4.16).

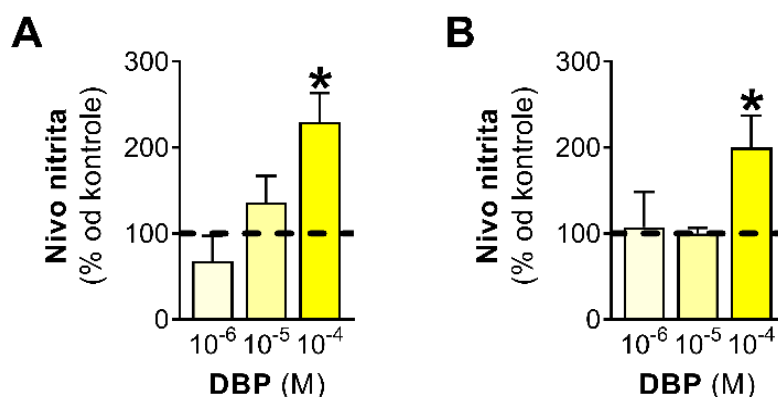


Slika 4.4.16. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na angiogenezu u uslovima *in vitro* u prisustvu inhibitora signalnih puteva ERK1/2, PI3K/Akt i eNOS-NO. EA.hy926 ćelije su 45 min pretretirane sledećim inhibitorima: U0126 (10 μ M), vortmaninom (1 μ M) i L-NAME (100 μ M), a zatim izlagane i 10^{-4} M DBP. Nakon 24 h izlaganja, ispitan je uticaj tretmana i inhibitora na formiranje endotelnih tuba u uslovima *in vitro* korišćenjem trodimenzionalnog matriksa Cultrex BME. Formiranje endotelnih tuba je posmatrano pod svetlosnim mikroskopom nakon 8 h. Prikazane su reprezentativne fotomikrografije. Kvantitativna analiza je urađena korišćenjem alata Angiogenesis Analyzer iz programa Image J. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat ukupne dužine tuba u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3–4 nezavisna eksperimenta. * p <0,05 statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; Δp <0,05 statistički značajna razlika u odnosu na 10^{-5} M DBP.

4.4.17. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na stvaranje azot-monoksida

Stvaranje NO je indirektno određivano merenjem koncentracije nitrita u medijumu EA.hy926 ćelija koje su prethodno izlagane 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP u trajanju od 24 i 48 h.

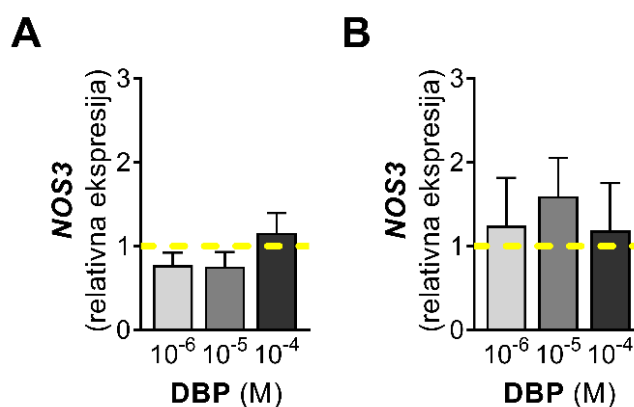
Rezultati su pokazali povećano stvaranje NO u obe vremenske tačke samo sa najvećom koncentracijom DBP, i to za 130% u odnosu na kontrolu nakon 24 h i za 100% u odnosu na kontrolu nakon 48 h izlaganja (slika 4.4.17).



Slika 4.4.17. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na stvaranje azot-monoksida. Nakon (A) 24 h i (B) 48 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M), posredno je ispitan uticaj tretmana na stvaranje NO preko merenja koncentracije nitrita u medijumu metodom po Griess-u. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat nivoa nitrita u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4–8 nezavisnih eksperimenata. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.4.18. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za eNOS

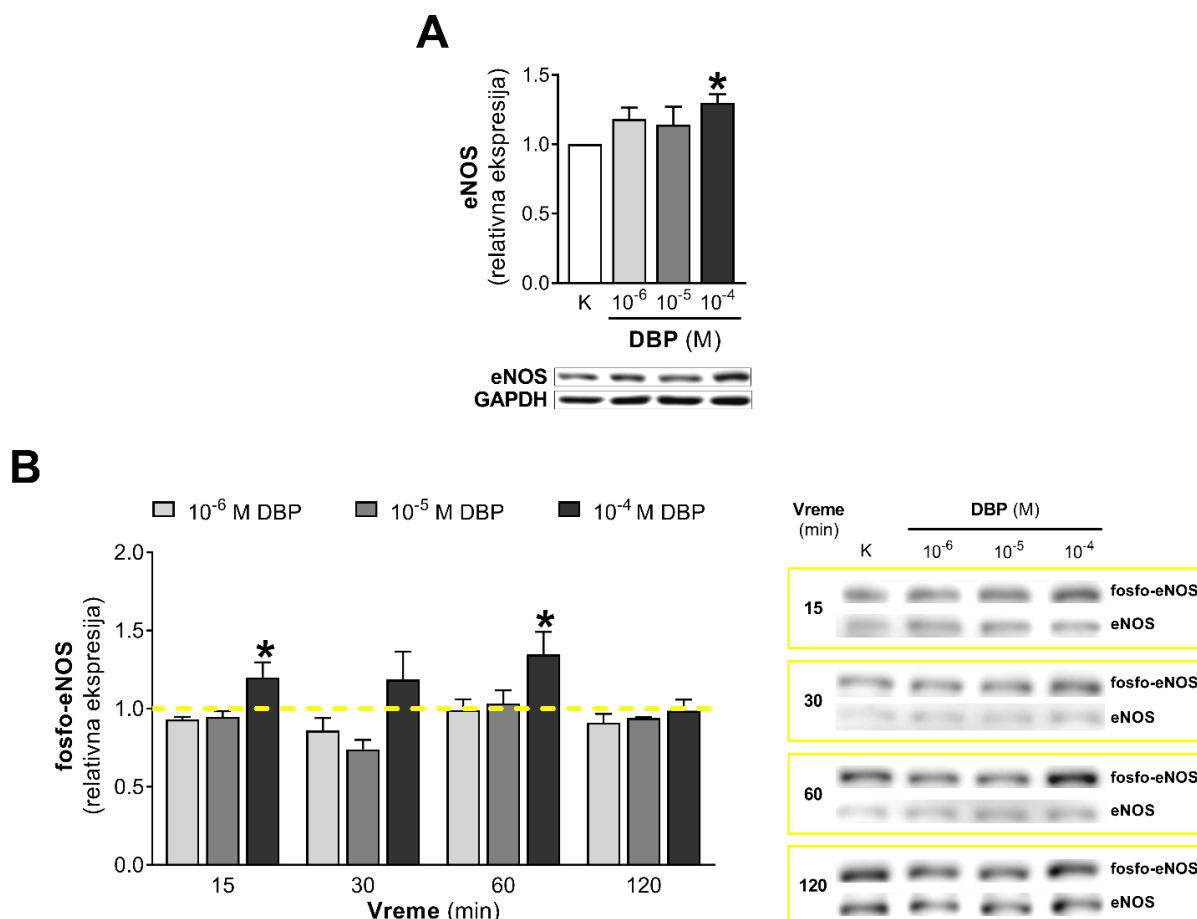
Metodom RT-qPCR je u svetlu prethodno dobijenih rezultata ispitano da li kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP utiče na relativnu ekspresiju gena za eNOS. Rezultati su pokazali da nakon 24 h i 48 h izlaganja ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama DBP nije bilo značajnih razlika u ekspresiji gena koji kodira eNOS u odnosu na kontrolu (slika 4.4.18).



Slika 4.4.18. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na relativnu ekspresiju gena za eNOS. Nakon (A) 24 h i (B) 48 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju gena za eNOS (*NOS3*) korišćenjem metode RT-qPCR. Dobijene vrednosti su izražene kao relativna ekspresija u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3–6 nezavisnih eksperimenata.

4.4.19. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na ekspresiju i aktivaciju eNOS

S obzirom na to da su prethodni rezultati pokazali povećano stvaranje NO nakon 24 h i 48 h izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-4} M DBP, a da istovremeno nisu detektovane razlike u relativnoj ekspresiji gena za eNOS, u sledećem koraku je metodom Western blot određivana ekspresija i aktivacija eNOS (praćenjem aktivacione fosforilacije na Ser1177). Rezultati su pokazali da je ekspresija eNOS povećana za ~30% u odnosu na kontrolu nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-4} M DBP (slika 4.4.19A). Pored toga, zapažena je povećana ekspresija aktivirane forme eNOS nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-4} M DBP, i to za 20% u odnosu na kontrolu nakon 15 min i za ~35% u odnosu na kontrolu nakon 60 min izlaganja (slika 4.4.19B).

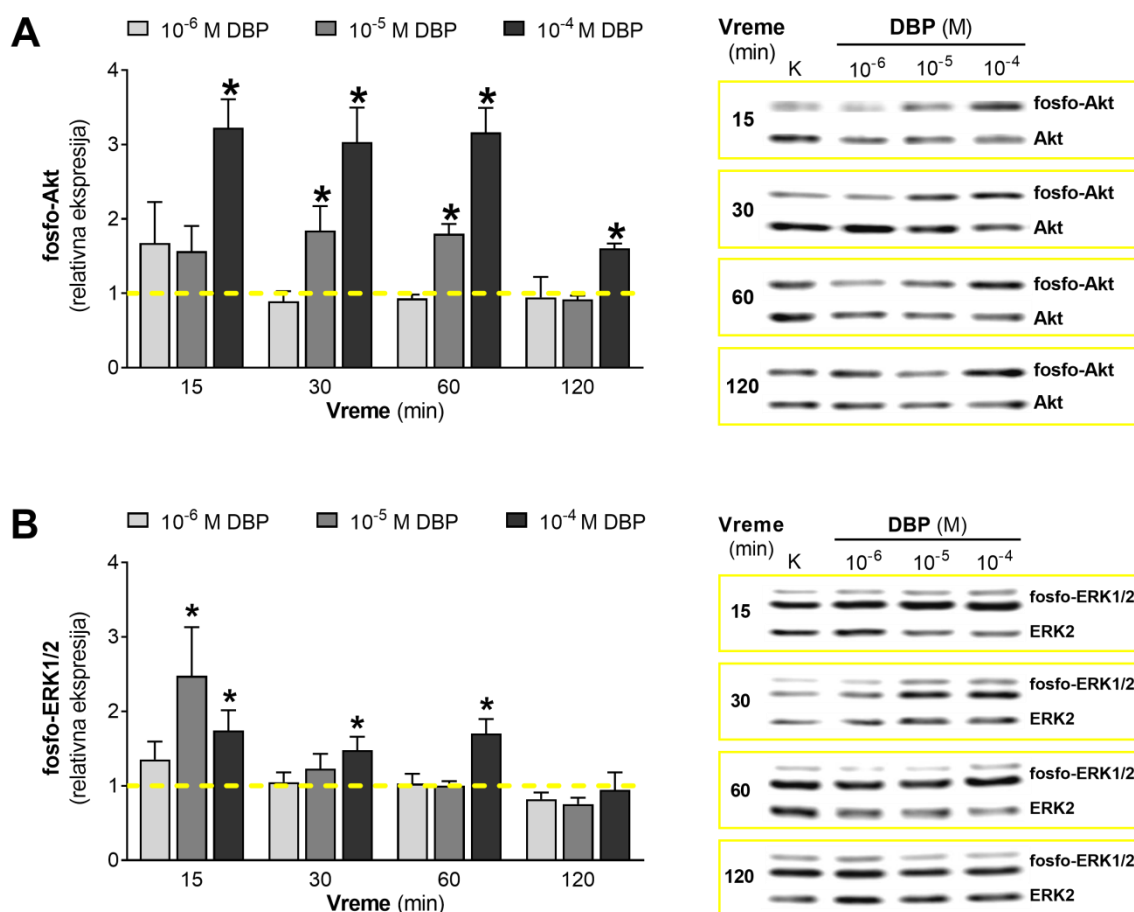


Slika 4.4.19. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na ekspresiju i aktivaciju eNOS. (A) Nakon 24 h izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju eNOS metodom Western blot. Prikazane su reprezentativne Western blot slike. Kvantifikacija je urađena korišćenjem programa Image J. Dobijene vrednosti za svaki uzorak su normalizovane na nivo GAPDH u datom uzorku, a rezultati su izraženi relativno u odnosu na normalizovani nivo eNOS u kontroli (1). (B) Nakon 15 min, 30 min, 60 min i 120 min izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju fosfo-eNOS metodom Western blot. Prikazane su reprezentativne Western blot slike; K – kontrola. Kvantifikacija je urađena korišćenjem programa Image J. Dobijene vrednosti za svaki uzorak su normalizovane na nivo nefosforilisane forme eNOS u datom uzorku, a rezultati su izraženi relativno u odnosu na normalizovani nivo fosfo-eNOS u kontroli (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3–7 nezavisnih eksperimenata. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.4.20. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na aktivaciju Akt i ERK1/2

Metodom Western blot je zatim ispitano da li kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP utiče na aktivaciju Akt i ERK1/2, odnosno aktivaciju signalnih puteva PI3K/Akt i ERK1/2. Rezultati su pokazali stabilno povećanje ekspresije fosfo-Akt nakon izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-4} M DBP u trajanju od 15 min, 30 min, 60 min i 120 min, i to za 222,5%, ~203%, ~216% i 60,5% u odnosu na kontrolu, redom. Pored toga, pokazana je povećana ekspresija fosfo-Akt i nakon izlaganja ćelija 10^{-5} M DBP u trajanju od 30 min i 60 min, i to za 84,4% i ~80% u odnosu na kontrolu, redom (slika 4.4.20A).

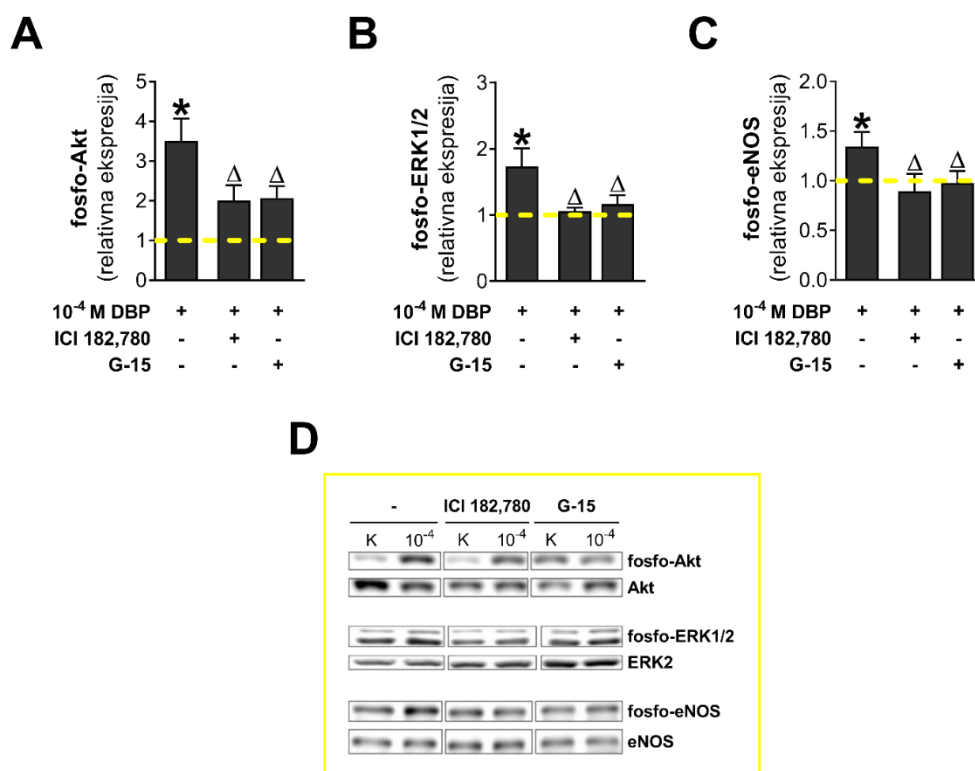
Rezultati ispitivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP na aktivaciju ERK1/2 su pokazali povećanu ekspresiju fosforilisanе forme ERK1/2 nakon izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-4} M DBP u trajanju od 15 min, 30 min i 60 min, i to za ~74,5%, ~40%, i 70,3% u odnosu na kontrolu, redom. Sa druge strane, izlaganje ćelija 10^{-5} M DBP u trajanju od 15 min je dovelo do kratkotrajnog i prolaznog povećanja ekspresije fosfo-ERK1/2 od ~148% u odnosu na kontrolu (slika 4.4.20B).



Slika 4.4.20. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na aktivaciju Akt i ERK1/2. Nakon 15 min, 30 min, 60 min i 120 min izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP (10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M), ispitan je uticaj tretmana na ekspresiju fosforilisanih formi (A) Akt i (B) ERK1/2 metodom Western blot. Prikazane su reprezentativne Western blot slike; K – kontrola. Kvantifikacija je urađena korišćenjem programa Image J. Dobijene vrednosti za svaki uzorak su normalizovane na nivo nefosforilisanе forme proteina u datom uzorku, a rezultati su izraženi relativno u odnosu na normalizovani nivo (A) fosfo-Akt i (B) fosfo-ERK1/2 u kontroli (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3–8 nezavisnih eksperimenata. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

4.4.21. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na aktivaciju Akt, ERK1/2 i eNOS u prisustvu antagonista ER i GPER

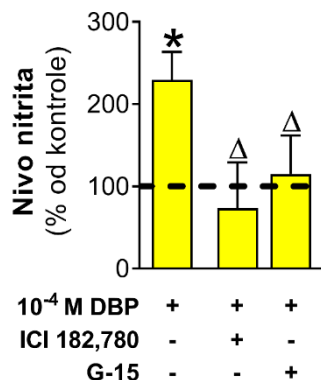
Uzimajući u obzir rezultate koji su pokazali da je efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-6} M, 10^{-5} M i 10^{-4} M DBP na različite funkcijske odgovore endotelnih ćelija posredovan ER i GPER, a u cilju dobijanja direktne potvrde da DBP u endotelnim ćelijama aktivira signalne puteve PI3K/Akt, ERK1/2 i eNOS-NO preko ER, EA.hy926 ćelije su izlagane 10^{-4} M DBP u prisustvu antagonista klasičnog ER ICI 182,780 i GPER G-15, a zatim je praćena ekspresija fosforilisanih formi Akt, ERK1/2 i eNOS. Rezultati su pokazali da oba antagonista delimično, ali statistički značajno smanjuju aktivaciju Akt (slika 4.4.21A i D), dok je ekspresija fosfo-ERK1/2 (slika 4.4.21B i D) i eNOS (slika 4.4.21C i D) u potpunosti vraćena na nivo kontrole.



Slika 4.4.21. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na aktivaciju Akt, ERK1/2 i eNOS u prisustvu antagonista ER i GPER. EA.hy926 ćelije su 45 min pretretirane: ICI 182,780 (10 μ M) i G-15 (10 μ M), a zatim izlagane i 10^{-4} M DBP. Nakon (A, B) 15 min i (C) 60 min izlaganja, ispitan je uticaj pretretmana i tretmana na ekspresiju fosforilisane forme (A) Akt, (B) ERK1/2 i (C) eNOS metodom Western blot. (D) Prikazane su reprezentativne Western blot slike; K – kontrola, 10^{-4} – 10^{-4} M DBP. Kvantifikacija je urađena korišćenjem programa Image J. Dobijene vrednosti za svaki uzorak su normalizovane na nivo nefosforilisane forme proteina u datom uzorku, a rezultati su izraženi relativno u odnosu na normalizovani nivo (A) fosfo-Akt, (B) fosfo-ERK1/2 i (C) fosfo-eNOS u kontroli (1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4–7 nezavisnih eksperimenata. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; ^Δ $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na 10^{-4} M DBP.

4.4.22. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na stvaranje azot-monoksida u prisustvu antagonista ER i GPER

Određivana je koncentracija nitrita u medijumu EA.hy926 ćelija koje su 24 h izlagane 10^{-4} M DBP u prisustvu antagonista ICI 182,780 i G-15. Rezultati su pokazali da su oba antagonista u potpunosti vratila stvaranje NO na nivo kontrole (slika 4.4.22), što predstavlja direktnu potvrdu da DBP u EA.hy926 ćelijama stimuliše stvaranje NO preko ER i GPER.



Slika 4.4.22. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu na stvaranje azot-monoksida u prisustvu antagonista ER i GPER. EA.hy926 ćelije su 45 min pretretirane: ICI 182,780 (10 μ M) i G-15 (10 μ M), a zatim izlagane i 10^{-4} M DBP. Nakon 24 h izlaganja, posredno je ispitan uticaj tretmana i inhibitora na stvaranje NO preko merenja koncentracije nitrita u medijumu metodom po Griess-u. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat nivoa nitrita u odnosu na kontrolu koja je prikazana horizontalnom isprekidanom linijom (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3–8 nezavisnih eksperimenata. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; [^] $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na 10^{-4} M DBP.

5. Diskusija

Uzimajući u obzir da KVB predstavljaju značajan zdravstveni i socio-ekonomski problem u savremenom društvu, neophodne su sveobuhvatne studije koje bi doprinele produbljivanju saznanja o vezi između zagađujućih supstanci iz radnog i životnog okruženja i ovih bolesti, a u cilju identifikovanja onih supstanci koje predstavljaju faktor rizika za razvoj KVB. Osim toga, razumevanje mehanizama bolesti je od ključnog značaja za formulisanje efikasnih strategija prevencije i spoznaje novih mogućnosti za terapijske intervencije. Tek je na osnovu svih dobijenih podataka moguće izvršiti adekvatnu procenu rizika, sprovesti sve neophodne mere zaštite i uskladiti postojeće zakonske regulative, kako bi se ograničila upotreba štetnih hemikalija i na taj način smanjila izloženost ljudi i prevalenca KVB u ljudskoj populaciji. Procena rizika za određenu hemikaliju tradicionalno podrazumeva čitav niz precizno definisanih eksperimenata koji se sprovode na velikom broju životinja u cilju određivanja nivoa štetnosti ispitivane hemikalije. Pored očiglednih etičkih dilema koje sa sobom nosi, ovaj vid testiranja toksičnosti i potencijalnih neželjenih efekata nije praktičan iz više razloga, jer zahteva značajne investicije u pogledu vremena i novca, ne pruža mogućnost testiranja velikog broja supstanci u određenom vremenu, kao i evaluaciju novih materijala kao što su biomaterijali i biopolimeri, niti pruža mogućnost definisanja specifičnih mehanizama preko kojih određene hemikalije ispoljavaju svoju toksičnost. Pored toga, postoje i problemi vezani za ekstrapolaciju i interpretaciju podataka dobijenih na životinjskim modelima na ljude (Thomas i sar., 2019). Otuda su se poslednjih godina pojavili novi trendovi u toksikološkim istraživanjima koji nalažu razvoj inovativnih metodoloških pristupa koji bi se primenili u uslovima *in vitro* na humanim ćelijskim linijama kao model sistemu. Ova alternativa tradicionalnoj proceni rizika je predložena od strane United States National Research Council, Tox21 Program, i European Commission's Advisory Group for Endocrine Disruptors u dokumentu pod nazivom „*Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*” (Krewski i sar., 2010). Centralna ideja ove vizije podrazumeva identifikaciju molekulskih i ćelijskih puteva koji se aktiviraju različitim zagađujućim supstancama iz radnog i životnog okruženja, tzv. „puteva toksičnosti”, ali i utvrđivanje raspona doza i/ili vremena koji će dovesti do promena u ćelijskoj signalizaciji, kao i do neželjenih efekata po zdravlje ljudi.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju originalan naučni doprinos u pravcu rasvetljavanja efekata koje dugotrajno i kratkotrajno izlaganje odabranim koncentracijama BPA i DBP izaziva na humanim endotelnim ćelijama u uslovima *in vitro*, kao i mehanizama delovanja ovih endokrinih ometača u endotelnim ćelijama, što može imati značajne implikacije na nivou kardiovaskularnog sistema u celini.

5.1. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A

Uprkos velikom broju dostupnih informacija o BPA kao endokrinom ometaču, debata o potencijalnim opasnostima koje izlaganje BPA predstavlja po ljudsko zdravlje i dalje traje. Uzrok tome su kontradiktorni podaci dobijeni iz istraživanja sprovedenih u akademskim centrima i iz klasičnih regulatornih toksikoloških studija (Prins i sar., 2019; vom Saal, 2019). U ovoj doktorskoj disertaciji identifikovani su do sada nepoznati efekti BPA na humane makrovaskularne endotelne ćelije u uslovima *in vitro* i pokazano je da dugotrajno izlaganje ćelija niskim koncentracijama BPA, koje odgovaraju realnoj izloženosti ljudske populacije ovom endokrinom ometaču, ne dovodi do promena u endotelnim ćelijama koje se mogu dovesti u vezu sa nastankom endotelne disfunkcije i posledično ateroskleroze. Detaljnije, dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama BPA u trajanju od više nedelja prolazno smanjuje adheziju monocita za jednosloj endotelnih ćelija i smanjuje relativnu ekspresiju gena za VCAM-1. Navedeni podaci su neočekivani zbog toga što se zna da endotelne ćelije regrutuju monocite u ranim fazama nastanka vaskularne inflamacije i ateroskleroze, a taj proces je omogućen koordinisanim

delovanjem CAM. Upravo je VCAM-1 jedan od CAM koji ima važnu ulogu u sporom kotrljanju monocita preko endotelnih ćelija i krucijalan je u ranim fazama regrutovanja monocita (Mestas i Ley, 2008). Poseban značaj imaju rezultati koji pokazuju da je izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama BPA u trajanju od četrnaest nedelja u izvesnoj meri poništilo stimulišući efekat TNF- α na vezivanje U937 monocita za jednosloj endotelnih ćelija i povećanje relativne ekspresije gena za sva tri ispitivana adhezivna molekula ICAM-1, VCAM-1 i E-selektin. Ovi podaci ukazuju na to da dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija nanomolarnim koncentracijama BPA izaziva odgovore suprotne onima koje manifestuje proinflamacijski citokin TNF- α na endotelne ćelije, odnosno da BPA ispoljava antiinflamacijski efekat na humane endotelne ćelije. Pored toga, dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija BPA je imalo pozitivan uticaj na integritet polupropustljive endotelne barijere, što se ogleda u smanjenoj propustljivosti jednosloja endotelnih ćelija i povećanoj ekspresiji dva proteina koji ulaze u sastav TJ, okcludina i ZO-1. Uočeno je da su međućelijske veze između endotelnih ćelija podložne dinamičkom remodelovanju kao odgovor na brojne spoljašnje faktore i patološka stanja, pa tako proinflamacijski stimuli poput trombina, histamina i TNF- α povećavaju endotelnu propustljivost, dok antiinflamacijski medijatori poput S1P i angiopoetina-1 smanjuju propustljivost endotela (Cerutti i Ridley, 2017). Promene u ekspresiji, distribuciji i strukturi proteina koji ulaze u sastav TJ između endotelnih ćelija mogu dovesti do mnogih vaskularnih bolesti i patoloških stanja (Cong i Kong, 2020). Neophodno je istaći da pozitivni efekti BPA na međućelijske TJ i paracelularnu permeabilnost humanih makrovaskularnih endotelnih ćelija do sada nisu objavljeni u literaturi, zbog čega ovi rezultati predstavljaju važan podatak.

Adhezija i migracija predstavljaju dve suprotne ali blisko povezane i koordinisane funkcije endotelnih ćelija koje imaju važnu ulogu u održavanju stabilnosti i integriteta endotela tokom reparacije povrede krvnog suda i angiogeneze. Čvrsta adhezija endotelnih ćelija za komponente ECM je neophodna za održavanje integriteta endotela, dok je oslabljena adhezija neophodna da bi se omogućila migracija endotelnih ćelija (Lee i sar., 2001; Lamalice i sar. 2007). U ovom radu je pokazano da direktno izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama BPA u trajanju od nekoliko nedelja povećava adheziju ćelija za komponente ECM i smanjuje migraciju EA.hy926 ćelija, što sugerše da dugotrajno izlaganje doprinosi očuvanju integriteta endotela sa jedne strane, ali i smanjenju kapaciteta endotelnih ćelija za popravku oštećenja na krvnom sudu sa druge. Kako regulacija ćelijske adhezije i migracije podrazumeva koordinisane mehanizme poput ćelijske signalizacije, remodelovanja citoskeleta i redistribucije integrina na površini ćelije (Michaelis, 2014), dalja istraživanja su neophodna da bi se utvrdila tačna uloga BPA u ovim procesima u endotelnim ćelijama. Pored toga, rezultati dobijeni u ovom radu bi se mogli u budućim studijama upotpuniti ispitivanjem angiogeneze, odnosno sposobnosti EA.hy926 ćelija da formiraju cevaste strukture u želatinoznom matriksu koji po sastavu odgovara bazalnoj membrani. Ovakva istraživanja su važna, jer je poznato da deregulacija faktora uključenih u proces angiogeneze i sama angiogeneza imaju ključnu ulogu u patofiziologiji brojnih bolesti kod ljudi (Carmeliet i Jain, 2000).

Važno je napomenuti da su, u ovom delu doktorske disertacije, u uslovima dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama BPA, detektovane promene u vijabilnosti ćelija nakon četrnaest nedelja izlaganja i da je taj odgovor po svojoj prirodi bio nemonotono dozno-zavisna (eng. *non-monotonic dose response*, NMDR), s obzirom na to da najveći pad u vijabilnosti EA.hy926 ćelija nije detektovan sa najvećom primenjenom koncentracijom BPA od 10^{-7} M, već sa 10^{-8} M BPA. Kontroverze oko NMDR postoje već više od 20 godina. Ranih 2000-ih godina je NMDR primećen u većem broju studija nakon izlaganja ćelija BPA u uslovima *in vitro* (Wetherill i sar., 2002; Wozniak i sar., 2005), što je u tom trenutku predstavljalo potpuno novi fenomen u toksikološkim istraživanjima u suprotnosti sa do tada široko prihvaćenim tradicionalnim pristupom koji je podrazumevao identifikaciju isključivo monotonih dozno-zavisnih odgovora nakon izlaganja ćelija određenoj hemikaliji. Potom je 2014. godine Laura Vandenberg zaključila da je NMDR uobičajen za studije u kojima je BPA korišćen u uslovima *in vitro* i da se pojavljuje u više od 20% eksperimenata, kao i da se uočava u najmanje jednom

rezultatu u više od 30% studija koje su adekvatno osmišljene i sprovedene sa ciljem da se ispituju odgovori ćelija spram različitih doza ispitivane supstance (Vandenberg, 2014). Autorka je iznela argumente da različiti faktori koji se tiču postavke eksperimenta mogu uticati na identifikaciju ćelijskih odgovora, što je jasno prikazano u 28 eksperimenata sprovedenih u okviru 24 različite studije koje su ispitivale efekte BPA na proliferaciju ćelija. Vandenberg je zaključila da u nekim studijama proliferacija ćelija nije bila izmenjena pod uticajem BPA, u drugim studijama su opisani samo monotoni odgovori, dok su u izvesnom broju studija zapaženi NMDR kada se posmatra proliferacija ćelija (Vandenberg, 2014). Međutim, analizi rezultata dobijenih u okviru pomenutih studija treba pristupiti oprezno zbog toga što su u navedenim studijama korišćeni različiti tipovi ćelija, različite koncentracije BPA, kao i različiti testovi kojima je ispitivana proliferacija ćelija. Treba istaći da, iako je u literaturi opisan mehanizam preko kog BPA ispoljava NMDR u uslovima *in vitro* (Villar-Pazos i sar., 2017), NMDR za BPA još uvek nije u potpunosti prihvaćen koncept u široj naučnoj zajednici, pogotovo kada se uzme u obzir biološki značaj nemonotonih odgovora koji su identifikovani *in vivo*, što je istaknuto u sveobuhvatnoj analizi studije sprovedene u okviru programa The Consortium Linking Academic and Regulatory Insights on BPA Toxicity (CLARITY-BPA) objavljenoj 2019. godine (Badding i sar., 2019) i naučnom stavu koji je 2021. godine objavljen od strane EFSA (More i sar., 2021). U nedavno objavljenoj studiji iz naše laboratorije, u kojoj su prikazani rezultati globalne analize ekspresije iRNK EA.hy926 ćelija koje su izlagane 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA u trajanju od četrnaest nedelja, pokazali smo da je izlaganje ćelija najmanjoj koncentraciji BPA od 10^{-9} M dovelo do promena u ekspresiji najvećeg broja gena, što implicira da najmanja koncentracija BPA može da izazove više štetnih efekata u EA.hy926 ćelijama nego 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA (Stanic i sar., 2023). NMDR na nivou ekspresije gena nakon izlaganja niskim koncentracijama BPA je zapažen i na nekim drugim biološkim modelima, kao što je ćelijska linija MCF7 (Shioda i sar., 2013) i materica kod pacova (Leung i sar., 2020). Sa druge strane, u ovom delu doktorske disertacije, nakon dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama BPA, zapaženi su uglavnom monotoni dozno-zavisni odgovori kada je u pitanju većina ispitivanih funkcija endotelne ćelije. Tako je dugotrajno izlaganje 10^{-7} M BPA i, u manjoj meri, 10^{-8} M BPA imalo efekta na najveći broj ispitivanih funkcijskih parametara EA.hy926 ćelija, dok koncentracija od 10^{-9} M BPA nije ispoljila sličan efekat. Ova zapažanja su od značaja jer ukazuju na činjenicu da promene na nivou ekspresije gena nakon dugotrajnog izlaganja ćelija nanomolarnim koncentracijama BPA ne moraju nužno da koreliraju sa fiziološkim efektima. Do sličnih zapažanja su došli i Leung i saradnici koji su izlagali ženke pacova BPA u trajanju od jedne godine, što je dovelo do NMDR na nivou ekspresije gena u materici, međutim, detektovane promene na nivou iRNK nisu dovele do značajnijih promena kada su u pitanju funkcijski odgovori kao što su proliferacija ćelija, apoptoza i histopatološke promene u materici (Leung i sar. 2020). Interesantno je napomenuti da se na različitim nivoima biološke organizacije mogu dobiti različiti dozno-zavisni odgovori nakon izlaganja niskim koncentracijama BPA, što je koncept koji je ranije pokazan na primeru mlečnih žlezda nakon izlaganja E2 (Vandenberg i sar., 2006). Slično razmišljanje je istaknuto u preglednom radu Laure Vandenberg i saradnika u kom su autori izneli argumente da nivo biološke organizacije na kom se ispituju efekti hemikalija (uključujući ekspresiju gena, nivo ćelija, tkiva, organa ili celokupnog organizma) može u značajnoj meri da utiče na to da li će efekti izlaganja niskim koncentracijama neke hemikalije biti detektovani, a zatim i kako će biti interpretirani (Vandenberg i sar., 2012).

Na osnovu analize rezultata dobijenih u okviru ispitivanja efekata dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama BPA, može se zaključiti da BPA ne dovodi do promena u endotelne ćelijama koje se mogu dovesti u vezu sa endotelnom disfunkcijom, već naprotiv, dovodi do niza funkcijskih i molekularnih promena koje pospešuju fiziološke funkcije endotelne ćelije. Iako naizgled neočekivani, ovi rezultati nisu nužno u koliziji sa rezultatima dobijenim iz epidemioloških studija (pregledni radovi Gao i Wang, 2014; Posnack, 2014; Han i Hong, 2016) i istraživanja na životinjskim modelima (Fang i sar., 2014; Kim i sar., 2014b; Sui i sar., 2014; Fang i sar., 2015; Sui i sar., 2018), već ih dopunjuju. Značaj ovih

istraživanja se ogleda, pre svega, u činjenici da su zapaženi efekti BPA na humane endotelne ćelije direktni, za razliku od epidemioloških studija kod kojih postoje brojni faktori koji mogu uticati na interpretaciju dobijenih rezultata i istraživanja na eksperimentalnim životinjama kod kojih je zbog razlike između bioloških vrsta ekstrapolacija dobijenih rezultata često znatno otežana. Može se izneti argument da eksperimentalni pristup primenjen u ovom radu ne imitira u potpunosti realni scenario izloženosti humanih endotelnih ćelija BPA zbog toga što se ovaj endokrini ometač metabolize u ljudskom organizmu i zbog toga što su biomonitoring studije pokazale da glavni metabolit BPA u organizmu BPA-glukuronid nema estrogensku aktivnost (pregledni rad Ma i sar., 2019). Ipak, nekonjugovani BPA se rutinski detektuje kao roditeljska hemikalija u ljudskoj krvi u koncentraciji od 1 ng/mL (4,4 nM) (pregledni rad Vandenberg i sar., 2010). Pored toga, Kaddar i saradnici su pokazali da nivoi nekonjugovanog BPA u plazmi 70% pacijenata na dijalizi prelaze vrednosti od 10 ng/mL (Kaddar i sar., 2009). Ovi podaci ukazuju na to da je opšta populacija, a pogotovo osetljive grupe, interno izložena nekonjugovanom BPA. Nadalje, prepoznato je da je toksikokinetika BPA drugačija kada se primenjuje kontinuirano u odnosu na jednokratnu, akutnu izloženost (Vandenberg i sar., 2010). Stahlhut i saradnici su pokazali da je poluživot BPA u ljudskom organizmu značajno duži u odnosu na prethodne procene koje su iznosile manje od 6 h (Stahlhut i sar., 2009). Potencijalno objašnjenje za to neslaganje leži u činjenici da kontinuirana izloženost BPA tokom života i njegovo taloženje u tkivima bogatim lipidima može da ima za posledicu hronično izlaganje BPA koje uključuje i značajno interno izlaganje ovoj supstanci u njenoj nekonjugovanoj formi. Upravo takav direktan i kontinuiran kontakt nekonjugovanog BPA sa humanim makrovaskularnim endotelnim ćelijama je imitiran u ovoj studiji u kojoj su EA.hy926 ćelije dugotrajno izlagane BPA u uslovima *in vitro*, što dobijene rezultate, ali i samo istraživanje, čini relevantnim.

Stalno povećano stvaranje NO sve do kraja četrnaeste nedelje izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-7} M BPA može da pruži uvid u potencijalne mehanizme preko kojih BPA utiče na humane endotelne ćelije. U fiziološkim uslovima endotelne ćelije kontinuirano proizvode male količine NO koji ima protektivnu antiinflamacijsku ulogu u vaskulaturi, dok se smanjeno stvaranje NO javlja u različitim patološkim stanjima i direktno je u vezi sa endotelnom disfunkcijom i vaskularnom inflamacijom (Steyers i Miller, 2014). Sinteza NO u endotelnim ćelijama je pod uticajem čitavog niza različitih stimulusa, a regulisana je promenama kako na nivou transkripcije gena za eNOS, tako i na nivou posttranslacionih modifikacija. Tako je, na primer, pokazano da estrogenski hormoni u vaskulaturi povećavaju ekspresiju eNOS (pregledni rad Chambliss i Shaul, 2002), dok inflamacijski citokini poput TNF- α snižavaju ekspresiju eNOS na taj način što inhibišu aktivnost promotora u genu za eNOS i skraćuju poluživot iRNK za eNOS (Kleinbongard i sar., 2010). Povećano stvaranje NO detektovano u EA.hy926 ćelijama koje su dugotrajno izlagane 10^{-7} BPA ne zavisi nužno samo od ekspresije eNOS s obzirom na to da su ovi eksperimenti pokazali da je relativna ekspresija gena za eNOS bila povećana samo nakon četrnaest nedelja izlaganja. Iako u ovom delu doktorske disertacije nije analizirana aktivacija odnosno fosforilacija eNOS, može da se spekulise da su povećana ekspresija gena za eNOS i aktivacija postojeće eNOS zaslužni za kontinuirano stvaranje NO tokom dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija BPA. Bez obzira na mehanizam kojim BPA povećava nivo NO, kontinuirano stvaranje NO tokom dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija BPA je najverovatnije zaslužno za neke od pozitivnih efekata BPA koji su identifikovani u ovom delu doktorske disertacije.

Pozitivni efekti BPA na humane endotelne ćelije mogu se objasniti činjenicom da je BPA po svojim osobinama i mehanizmu delovanja sličan estrogenskim hormonima. Ranije je utvrđeno da se BPA vezuje za sve tipove ER, uključujući klasične ER α i ER β , i GPER (Matthews i sar., 2001; Andersson i Brittebo, 2012). Važno je napomenuti da se estrogenski efekti BPA u eksperimentima na životinjama uočavaju sa koncentracijama BPA u plazmi koje su približne koncentracijama ovog endokrinog ometača koje su detektovane u ljudskoj plazmi (Collet i sar., 2010). Humane makrovaskularne endotelne ćelije ekspimiraju oba tipa klasičnog ER, kao i GPER (Isensee i sar., 2009; Kim i sar., 2014a). Aktivacijom ovih receptora od strane estrogenskih hormona se poboljšava

endotelna funkcija i ispoljavaju plejotropni efekti koji imaju protektivnu ulogu u vaskulaturi. Navedeno delovanje estrogenskih hormona u vaskulaturi je potvrđeno u populacionim studijama, istraživanjima na životinjama i eksperimentima na ćelijama u uslovima *in vitro* (pregledni rad Murphy, 2011). Detaljnije, pozitivni efekti estrogena u vaskulaturi uključuju smanjenu ekspresiju CAM u humanim endotelnim ćelijama nakon stimulacije sa citokinima (Caulin-Glaser i sar., 1996) i endotoksinom (Simoncini i sar., 2000a; Thor i sar., 2010). Pored toga, smanjena ekspresija VCAM-1 pod delovanjem 2-metilestradiola (prirodni metabolit E2) je u vezi sa smanjenim vezivanjem monocita za vaskularne endotelne ćelije koje su stimulisane endotoksinom (Zhang i sar., 2015), a detektovana je i smanjena endotelna propustljivost posredovana povećanom ekspresijom proteina koji ulaze u sastav TJ nakon izlaganja endotelnih ćelija estrogenskim hormonima (Ye i sar., 2003; Burek i sar., 2010). Navedeni efekti su u saglasnosti sa dobijenim rezultatima vezanim za pozitivne efekte BPA koji su prikazani u ovom delu doktorske disertacije, kao i sa rezultatima nekih drugih autora. Naime, Noguchi i saradnici su pokazali da BPA ispoljava efekte na endotelne ćelije krvnih sudova iz slezine miša upravo aktivacijom ER (Noguchi i sar., 2002), dok su Xu i saradnici pokazali da BPA u uslovima hipoksije indukuje proliferaciju i migraciju goveđih endotelnih ćelija na taj način što stimuliše ekspresiju VEGF preko HIF-1 α i signalne kaskade GPER/kaveolin-1/protein toplotnog šoka HSP90 (Xu i sar., 2017). Pored toga, pokazano je da BPA ispoljava pozitivan efekat na angiogenezu preko povećane ekspresije proteina inhibitora apoptoze koji je povezan sa X hromozomom, a što se dešava aktivacijom GPER, ali ne i ER α i ER β (Liu i sar., 2017).

Interesantno je da nakon četrnaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama BPA nije detektovano povećano vezivanje U937 monocita za jednosloj EA.hy926 ćelija, ali je ovo vezivanje bilo smanjeno nakon stimulacije EA.hy926 ćelija sa TNF- α , što je posledica smanjenog nivoa iRNK za ICAM-1, VCAM1 i E-selektin nakon dugotrajnog izlaganja ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama BPA. Ovi rezultati su potvrdili antiinflamacijski efekat BPA na endotelne ćelije. Simoncini i saradnici su pokazali da estrogenski hormoni u humanim endotelnim ćelijama smanjuju povećanje nivoa iRNK za VCAM-1 indukovano endotoksinom na taj način što smanjuju aktivnost kinaze inhibitora κ B (I κ B), čime se stabilizuje inhibitor NF- κ B, I κ Ba, a što posledično vodi ka inhibiciji signalnog puta NF- κ B (Simoncini i sar., 2000a). Usled potvrđenih estrogenskih svojstava BPA i njegove sposobnosti da se vezuje za ER, može se pretpostaviti da je BPA u ovom istraživanju ispoljio antiinflamacijske i antiaterogene efekte na endotelne ćelije preko inhibicije stimulišućeg delovanja TNF- α na signalni put NF- κ B. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se potvrdila sposobnost BPA da inhibiše signalni put NF- κ B u humanim endotelnim ćelijama, što prevazilazi ciljeve koji su postavljeni u ovoj doktorskoj disertaciji.

Inhibicija navedenih signalnih puteva koji su uključeni u kontrolu gorepomenutih procesa bi mogla da pruži uvid u do danas neidentifikovan mehanizam delovanja BPA u EA.hy926 ćelijama. Međutim, treba naglasiti da, premda eksperimentalni pristup primenjen u ovom delu doktorske disertacije omogućava praćenje funkcijskih odgovora endotelnih ćelija nakon izlaganja BPA tokom dužeg vremenskog perioda, postoje i neke poteškoće vezane za primenu ovog pristupa, a koje se ogledaju, pre svega, u ograničenim mogućnostima za ispitivanje signalnih puteva i mehanizama koji dovode do promena u funkcijskim odgovorima endotelnih ćelija. Naime, primena farmakoloških inhibitora tokom višenedeljnog izlaganja ćelija je tehnički zahtevna za sprovođenje, s obzirom na to da se tokom dužeg perioda izlaganja ne mogu izbeći potencijalni citotoksični i drugi neželjeni efekti inhibitora. Pored toga, promene u ispitivanim funkcijama endotelnih ćelija pod uticajem višenedeljnog izlaganja BPA mogu da se dešavaju u različitim nedeljama, što u značajnoj meri otežava primenu tačno određenog inhibitora u tačno određenom vremenskom okviru. Zbog navedenih razloga nije postojala mogućnost da se preciznije definiše molekularni mehanizam preko kog BPA ispoljava efekte na endotelne ćelije nakon dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija ovom endokrinom ometaču. Drugi potencijalni nedostatak ove studije se ogleda u činjenici da uticaj BPA

u organizmu nije izolovan, već podrazumeva istovremeni uticaj različitih faktora, uključujući i funkcionisanje celokupnog metaboličkog sistema. Sasvim je moguće da krajnji efekat BPA na funkcijske odgovore humanih makrovaskularnih endotelnih ćelija zavisi od ravnoteže između direktnog efekta BPA na ove ćelije i interakcije sa drugim faktorima i procesima u organizmu. Pored toga, relevantnost rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji treba uzeti sa zadržkom u kontekstu efekata koje BPA ispoljava u uslovima *in vivo*, jer treba uzeti u obzir eksperimentalni model koji je korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji – kontinuirana endotelna ćelijska linija poreklom od HUVEC. Izvesno je da postoje određene funkcijske razlike između EA.hy926 ćelija i primarnih humanih endotelnih ćelija (Baranska i sar., 2005), a pored toga, primarne ćelije poput HUVEC imaju ograničen životni vek, njihova izolacija iz pupčane vrpce je zahtevna, a dobijeni eksperimentalni rezultati često znatno variraju zbog činjenice da su ćelije poreklom od različitih donora (Bouš i sar., 2001). Za razliku od primarnih endotelnih ćelija, EA.hy926 ćelije imaju sposobnost da se neograničeno dele i proliferišu, te se mogu održavati u kulturi tokom dužeg vremenskog perioda bez značajnijeg gubitka njihovih fenotipskih i funkcijskih karakteristika, što je neophodno za uspešno izvođenje toksikoloških studija koje zahtevaju dugotrajno gajenje i izlaganje ćelija određenoj hemikaliji. Upravo zbog navedenih razloga u ovoj studiji nisu korišćene primarne endotelne ćelije, već ćelijska linija EA.hy926.

5.2. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija bisfenolu A

Rezultati ispitivanja efekata kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim višim koncentracijama BPA i farmakološkim inhibitorima su potvrdili neke od pozitivnih efekata koje BPA ispoljava u endotelnim ćelijama i podržali predložene mehanizme delovanja koji su uočeni tokom ispitivanja efekata dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama BPA u trajanju od četrnaest nedelja, kao što su smanjeno vezivanje monocita za jednosloj endotelnih ćelija, smanjena relativna ekspresija gena za VCAM-1, smanjena migracija ćelija i povećano stvaranje NO.

Do danas je objavljeno svega nekoliko radova u kojima su prikazani rezultati ispitivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja humanih endotelnih ćelija niskim koncentracijama BPA koje odgovaraju realnoj izloženosti prosečnog čoveka ovom EDC (Andersson i Brittebo, 2012; Ribeiro-Varandas i sar., 2014). Andersson i Brittebo (2012) su ispitivali uticaj kratkotrajnog izlaganja HUVEC ćelija odabranim koncentracijama BPA (10^{-10} M – 10^{-6} M BPA) na određene biomarkere koji se mogu dovesti u vezu sa endotelnom disfunkcijom, inflamacijom i angiogenezom u uslovima *in vitro*. Autori su pokazali da BPA povećava relativnu ekspresiju gena za odabrane proteine uključene u proces angiogeneze, aktivira eNOS, što posledično povećava stvaranje NO, i stimuliše formiranje endotelnih tuba. Čini se da povećano stvaranje NO predstavlja glavni odgovor endotelnih ćelija na izlaganje BPA, nezavisno od tipa izlaganja i tipa endotelnih ćelija koji je korišćen u eksperimentima. Rezultati studije na MSS31 ćelijama koje predstavljaju kontinuiranu liniju endotelnih ćelija poreklom iz krvnih sudova slezine miša podržavaju ovu premisu. Naime, Noguchi i saradnici su u navedenoj studiji ispitivali efekte kratkotrajnog izlaganja MSS31 ćelija suprafiziološkim koncentracijama BPA koje su više od onih koje se rutinski detektuju u humanoј plazmi, pri čemu su zaključili da izlaganje ćelija 10^{-5} M BPA u trajanju od 24 h povećava stvaranje NO putem negenomskog mehanizma, posredstvom ER (Noguchi i sar., 2002). Rezultati ove studije pokazuju da je koncentracija nitrita u medijumu povećana nakon izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-5} M BPA u trajanju od 1 h i 48 h i da je ovaj efekat ostvaren nezavisno od transkripcije gena za eNOS. Metodom Western blot i primenom farmakoloških antagonista estrogenskih receptora i inhibitora nishodnih molekula njihovih signalnih puteva pokazano je da BPA ispoljava direktan uticaj na EA.hy926 ćelije preko ER i GPER i aktivacijom signalnog puta PI3K/Akt, što za posledicu ima negenomski uticaj na povećanu fosforilaciju i aktivaciju eNOS i posledično povećano stvaranje NO. Ovi podaci ukazuju na potencijalni mehanizam preko kog BPA ispoljava protektivni efekat na

funkciju endotelnih ćelija, što podrazumeva aktivaciju signalnog puta posredovanog ER, a potom nizvodno PI3K/Akt i eNOS. Ovi rezultati su u skladu sa zapažanjima objavljenim u nekim ranijim studijama u kojima je opisano da estrogenski hormoni stimulišu stvaranje NO u endotelnim ćelijama preko negenomskih signalnih puteva koji podrazumevaju aktivaciju klasičnih i/ili neklasičnih ER, PI3K/Akt i eNOS (Haynes i sar., 2000; Simoncini i sar., 2000b). Zauzvrat, povećan nivo NO vodi ka smanjenoj ekspresiji različitih CAM na površini ćelija i drugih medijatora inflamacije, čime se inhibiše adhezija leukocita za jednosloj endotelnih ćelija (pregledni rad Förstermann i Sessa, 2012). S obzirom na značajnu ulogu koju NO ima u regulaciji endotelne funkcije i uzimajući u obzir to da se direktni efekti dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama BPA i kratkotrajnog izlaganja ćelija višim koncentracijama BPA u najvećoj meri podudaraju, može se zaključiti da BPA stimuliše stvaranje NO u endotelnim ćelijama, što predstavlja zaštitni mehanizam u sprečavanju endotelne disfunkcije i posledično ateroskleroze. Ipak, važno je istaći da se pojedini rezultati dobijeni u okviru ispitivanja efekata kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim višim koncentracijama BPA razlikuju od rezultata dobijenih iz dugotrajnog izlaganja ćelija nižim koncentracijama BPA. U pitanju su vijabilnost ćelija, vezivanje endotelnih ćelija za želatin, propustljivost jednosloja endotelnih ćelija u uslovima *in vitro* i sinteza ROS, što ukazuje na neophodnost daljih istraživanja kojima bi se utvrdio tačan mehanizam preko koga BPA ispoljava uticaj na humane endotelne ćelije.

5.3. Efekat dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu

Ljudi su svakodnevno izloženi DBP koji se pod delovanjem esteraza u gastrointestinalnom traktu brzo metaboliše do MBP. Poznato je da je upravo MBP glavni medijator toksičnih efekata na nivou ćelija. Iako ljudske ćelije nisu rutinski izložene DBP, u ovoj doktorskoj disertaciji je za potrebe dugotrajnog i kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija korišćen DBP, s obzirom na to da DBP i MBP pokazuju sličnu aktivnost u brojnim testovima sprovedenim na različitim ćelijama u uslovima *in vitro*, što se uočava pregledom United States Environmental Protection Agency Interactive Chemical Safety for Sustainability Dashboard – tzv. CompTox baze podataka ([CompTox Chemicals Dashboard](#)). Tako, na primer, DBP ima nešto niži limit citotoksičnosti u odnosu na MBP, dok je raspon AC₅₀ vrednosti dobijen u različitim testovima sličan za DBP i MBP (1–100 µM). Drugi razlog zbog koga je korišćen DBP za potrebe dugotrajnog i kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija je veliki broj podataka dobijenih iz eksperimenata sprovedenih u uslovima *in vitro* koji postoje u CompTox bazi podataka za DBP, što ukazuje na činjenicu da se upravo DBP uobičajeno koristi u brojnim istraživanjima u uslovima *in vitro*.

S obzirom na mali broj do danas objavljenih relevantnih studija na vaskularnim ćelijama, pogotovo onih koje se tiču dugotrajnog, hroničnog izlaganja endotelnih ćelija DBP, cilj ovog dela doktorske disertacije je bio da se ispituju promene koje se dovode u vezu sa endotelnom disfunkcijom nakon dugotrajnog izlaganja humane endotelne ćelijske linije EA.hy926 odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M) tokom dvanaest nedelja. Koncentracije DBP su odabrane na osnovu realne izloženosti ljudske populacije ovom EDC (Reddy i sar., 2006; Högberg i sar., 2008) i prisustva MBP u plazmi i urinu kod ljudi (Silva i sar., 2003; Becker i sar., 2009; Saravanabhavan i sar., 2013; Geens i sar., 2014; Gomez Ramos i sar., 2016). Koncentracija od 10^{-7} M DBP je uzeta za gornji limit koji se smatra niskom koncentracijom za potrebe studija koje se sprovode u uslovima *in vitro*, po uzoru na princip koji je ranije primenjen kod BPA (Wetherill i sar., 2007). I u ovom delu doktorske disertacije je kao model korišćena kontinuirana ćelijska linija EA.hy926 s obzirom na to da ove ćelije ispoljavaju morfološke, fenotipske i funkcijske karakteristike humanih makrovaskularnih endotelnih ćelija (Edgell i sar., 1990; Ahn i sar., 1995), a posebno zbog činjenice da se mogu uspešno održavati u kulturi tokom dužeg vremenskog perioda bez značajnijeg gubitka njihovih fenotipskih i funkcijskih karakteristika, što je već diskutovano ranije. Kada je u pitanju DBP, EA.hy926 ćelijska linija je do sada uspešno

korišćena za potrebe ispitivanja uticaja dugotrajnog izlaganja humanih endotelnih ćelija nanomolarnim koncentracijama ovog ftalata tokom četiri nedelje (Stanic i sar., 2022), ali i za potrebe kratkotrajnog izlaganja endotelnih ćelija širem opsegu koncentracija DBP u trajanju od 24 h (Kong i sar., 2022).

Kao i kod studije sa BPA, značaj ispitivanja uticaja dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP leži, pre svega, u činjenici da su zapaženi efekti DBP na humane endotelne ćelije direktni, a ne izmenjeni pod uticajem brojnih faktora koji uobičajeno otežavaju interpretaciju rezultata dobijenih u okviru epidemioloških studija i eksperimenata na životinjama. U svega nekoliko studija koje su sprovedene u uslovima *in vivo* je pokazano da izlaganje DBP dovodi do promena u kardiovaskularnom sistemu životinja. Pre svega, zapaženo je da ftalati deluju toksično na razvoj, odnosno strukturu i funkciju srca riba zebrića (*Danio rerio*) koje se često koriste kao pogodan model organizam za ispitivanje patogeneze bolesti srca kod ljudi. Tako je pokazano da izlaganje zebrića DBP i DEHP tokom embrionalnog razvoja dovodi do patoloških promena u srcu, uključujući i promene srčanog ritma (Mu i sar., 2020). Slične rezultate su objavili Sun i Li, pri čemu su opisali smanjen protok krvi i snabdevanje hranljivim materijama, inhibiciju rasta, perikardni edem, deformacije srca, kao i smanjenu i poremećenu srčanu frekvencu nakon izlaganja embriona zebrića DBP (Sun i Li, 2019). Međutim, važno je istaći da do danas nije opisan tačan mehanizam toksičnog delovanja DBP na nastanak, razvoj i progresiju KVB i ostalih bolesti koje nastaju usled disfunkcije vaskularnog endotela. Gotovo u potpunosti nedostaju podaci iz studija sprovedenih u uslovima *in vitro* koji bi objasnili mehanizam delovanja DBP na endotelne ćelije, a to znanje je neophodno da bi se razumeli efekti i opasnost izlaganja vaskularnog sistema ovom ftalatu. U nedavno objavljenoj studiji iz naše laboratorije smo prikazali eksperimentalne rezultate četvoronedelnog izlaganja EA.hy926 ćelija istim nanomolarnim koncentracijama DBP koje su korišćene u ovoj doktorskoj disertaciji (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M). U navedenom radu smo *in silico* analizom na osnovu relativne ekspresije gena, kako iz sopstvene, tako i iz drugih objavljenih relevantnih studija identifikovali tri najvažnije kategorije bolesti koje se mogu dovesti u vezu sa izlaganjem DBP i vaskularnom disfunkcijom: KVB, neurovaskularne/cerebrovaskularne bolesti i bolesti imunskog sistema, i time prvi put pokazali da izlaganje DBP predstavlja faktor rizika za pojavu različitih bolesti sa vaskularnom etiologijom (Stanic i sar., 2022).

Na osnovu svih dobijenih rezultata u ovom delu doktorske disertacije može se izvesti opšti zaključak da se efekti dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP ogledaju u promenama u pojedinim funkcijskim karakteristikama ovih ćelija koje mogu da se dovedu u vezu sa endotelnom disfunkcijom i nastankom ateroskleroze. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim u epidemiološkim studijama (pregledni radovi Mariana i sar., 2016; Mariana i Cairrao, 2020), na životinjskim modelima (pregledni radovi Foster i sar., 2000; Mariana i sar., 2016), kao i u malom broju do danas sprovedenih studija u uslovima *in vitro*, o čemu će biti posebno reči u narednim pasusima.

Vijabilnost ćelija se definiše kao broj zdravih ćelija u uzorku i često se određuje testom metaboličke aktivnosti kao što je alamarBlue™. Rezultati ove disertacije ukazuju na to da dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija različitim nanomolarnim koncentracijama DBP dovodi do minimalnih promena u vijabilnosti ćelija nakon šest i dvanaest nedelja. Uočeno je da DBP u koncentraciji od 10^{-7} M dovodi do prolaznog smanjenja vijabilnosti EA.hy926 ćelija nakon šest nedelja izlaganja, dok je nakon dvanaest nedelja smanjena vijabilnost uočena prilikom izlaganja ćelija 10^{-8} M DBP. S obzirom na to da slične studije na humanim makrovaskularnim endotelnim ćelijama do sada nisu rađene, rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji ne mogu da se uporede sa nekim relevantnim podacima drugih autora, ali mogu da se analiziraju podaci o proliferaciji nekih drugih endotelnih ćelija koji su dobijeni nakon izlaganja DBP. Proliferacija ćelija podrazumeva povećanje broja ćelija usled ćelijske deobe, te se određivanje proliferacije upotrebljava za procenu vitalnosti ili preživljavanja, pri čemu se detektuju ćelije koje se aktivno

dele. Rezultati ispitivanja vijabilnosti EA.hy926 ćelija nakon dugotrajnog izlaganja ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP mogu samo u izvesnoj meri da se uporede sa rezultatima studija u kojima je efekat DBP praćen na endotelnim ćelijama krvnih sudova rožnjače (Krüger i sar., 2012) i endometrijuma (Bredhult i sar., 2007). Tako su Krüger i saradnici pokazali da akutno (24 h) izlaganje endotelne ćelijske linije B4G12 različitim koncentracijama DBP (50, 100, 150 i 200 μM) dovodi do smanjene proliferacije ćelija i citotoksičnosti, koja je bila jače izražena u uslovima kada su ćelije izlagane DBP bez prisustva seruma u ćelijskom medijumu. Na osnovu dobijenih podataka, autori su izračunali IC_{50} vrednosti i zaključili da je IC_{50} vrednost dobijena u uslovima bez seruma ($30,6 \pm 12,7 \mu\text{M}$) gotovo dvostruko niža od one dobijene kada su ćelije gajene u normalnim uslovima u prisustvu seruma ($57,8 \pm 14,8 \mu\text{M}$) (Krüger i sar., 2012). Sa druge strane, Bredhult i saradnici su na primarnim humanim endotelnim ćelijama krvnih sudova endometrijuma pokazali da kratkotrajno izlaganje različitim koncentracijama DBP (0,1, 50 i 100 μM) u trajanju od 24 h smanjuje proliferaciju ćelija, s tim što je najizraženiji antiproliferacijski efekat imala upravo najviša koncentracija DBP, dok je citotoksični efekat DBP u smislu smanjenja vijabilnosti ćelija izostao (Bredhult i sar., 2007). Analizom ovih i naših rezultata može se zaključiti da citotoksični i antiproliferacijski efekat DBP na humane endotelne ćelije zavisi od korišćenih koncentracija ovog ftalata, dužine i uslova izlaganja ćelija, ali i od vrste endotelnih ćelija.

NO ima važnu ulogu u očuvanju homeostaze krvnog suda, dok u patološkim stanjima predstavlja mehanizam odbrane koji endotelne ćelije koriste da spreče dalji razvoj inflamacije i ateroskleroze (pregledni rad Newby, 2000). Smatra se da je u osnovi endotelne disfunkcije gubitak vazoprotektivnog efekta NO usled pojave oksidativnog stresa u endotelnim ćelijama koji snižava nivo NO. Promene u stvaranju i bioraspoloživosti NO se dovode u vezu sa vaskularnim poremećajima poput hipertenzije i ateroskleroze (Zhao i sar., 2015). Enzim eNOS je jedna od tri izoforme NOS koja je dominantno prisutna u endotelnim ćelijama gde katališe sintezu NO, koji zatim učestvuje u regulaciji brojnih funkcija endotela (Bu i sar., 2022). Tokom dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP, uočeno je da nema statistički značajnih promena u ekspresiji eNOS, kako na nivou iRNK, tako i na nivou proteina, ni u jednoj od ispitivanih nedelja i ni sa jednom od ispitivanih koncentracija DBP. Kada je u pitanju fosforilacija, odnosno aktivacija eNOS, rezultati pokazuju drugačiju dinamiku. Naime, nakon tri nedelje izlaganja nisu detektovane značajne promene u ekspresiji aktivirane eNOS, dok su nakon šest, devet i dvanaest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama DBP uočene statistički značajne promene koje su u skladu sa zapaženim povećanjem koncentracije nitrita u medijumu u navedenim nedeljama izlaganja. Ovi rezultati pokazuju da se povećano stvaranje NO u EA.hy926 ćelijama nakon dugotrajnog izlaganja odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP dešava preko aktivacije postojeće eNOS u ćelijama, a ne preko povećane transkripcije gena *NOS3* i posledičnog povećanja nivoa proteinskog produkta. Ovi rezultati su u izvesnoj meri u saglasnosti sa rezultatima Xie i saradnika koji su opisali uticaj DBP na signalni put eNOS-NO tako što su dugotrajno izlagali miševе DBP u trajanju od šest nedelja i zapazili da izlaganje ovom ftalatu dovodi do povećane ekspresije eNOS i povećanog stvaranja NO (Xie i sar., 2019b). Sa druge strane, ovi rezultati pokazuju da dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP nije uticalo na ekspresiju eNOS, ali je povećalo ekspresiju fosfo-eNOS. Razlike između prikazanih rezultata i rezultata opisanih u studiji Xie i saradnika mogu se objasniti, pre svega, razlikama između dva primenjena eksperimentalna pristupa (ispitivanja u uslovima *in vitro* s jedne strane, i eksperimenti na životinjama sa druge strane), kao i razlikama u korišćenim koncentracijama DBP i dužini izlaganja. Međutim, uprkos ovim razlikama, može se uočiti sličan trend u detektovanim odgovorima na izlaganje DBP. Treba istaći da je u skladu sa dobijenim povećanjem ekspresije fosforilisane forme eNOS pokazana i aktivacija signalnog puta PI3K/Akt, koji se nalazi uzvodno u signalnoj kaskadi u odnosu na eNOS. S obzirom na poznatu i dokazanu ulogu signalne kaskade PI3K/Akt u regulaciji aktivnosti eNOS (Zhao i sar., 2015), dobijeni rezultati sugerišu da DBP ispoljava efekat na eNOS i stvaranje NO upravo preko aktivacione fosforilacije Akt, i sledstvenog pokretanja signalnog puta PI3K/Akt.

ROS, uključujući $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 i $\bullet OH$, i reaktivne vrste azota, kao što su NO i $ONOO^-$, su biološki značajni derivati O_2 , koji su zbog izraženog oksido-redukcionog potencijala sve više prepoznati kao važni učesnici brojnih redoks-zavisnih procesa u vaskulaturi. Zbog svega navedenog, ROS imaju izuzetnu ulogu u fiziologiji i patofiziologiji endotela. Naime, fiziološka aktivacija endotela, između ostalog, najčešće podrazumeva isključivanje zaštitnih funkcija NO i prelazak na redoks signalne procese, odnosno pojačanu sintezu ROS. U patološkim stanjima, hronično stvaranje ROS može da premaši ćelijske antioksidativne mehanizme što dovodi do endotelne disfunkcije, povećane kontraktilnosti, rasta glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova, migracije monocita, peroksidacije lipida, propadanja endotelne ćelije, inflamacije i povećanog taloženja proteina ECM, a što sve zajedno predstavlja osnovne procese koji doprinose vaskularnom oštećenju i patogenezi KVB (Landmesser i Harrison, 2001; Touyz i Schiffrin, 2001). Postoje brojni dokazi da ROS imaju ključnu ulogu u patogenezi KVB (Cave i sar., 2006). U kardiovaskularnom sistemu, NADPH oksidaze se javljaju kao dominantni izvor ROS, pored ostalih identifikovanih izvora (Lassègue i Griendling, 2010). ROS su povišene u aterosklerozi i regulišu različite ćelijske puteve u ćelijama arterijskog zida koji utiču na adheziju ćelija, ekspresiju gena, apoptozu i proliferaciju (Thomas i sar., 2008). Treba napomenuti da je u pojedinim studijama utvrđeno da ftalati, uključujući i DBP, povećavaju stvaranje ROS kod ljudi i drugih sisara (Cheng i sar., 2019; Brassea-Pérez i sar., 2022), što je u suprotnosti sa ovde prikazanim rezultatima. Rezultat koji pokazuje da je u uslovima dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP detektovan uglavnom trend smanjenja nivoa ROS govori u prilog opštem obrascu povećanog stvaranja NO koji je uočen tokom dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija DBP. Međutim, ova činjenica sama po sebi ne znači da endotelne ćelije zaista smanjeno proizvode ROS kada su kontinuirano izložene DBP. Moguće je da se uprkos povećanom stvaranju ROS od strane NADPH oksidaza i razdvojenog enzima eNOS dostupnim testovima detektuje smanjen nivo ROS jer količina detektovanih ROS u ćelijama zavisi i od količine ROS koje se „troše” u reakciji sa NO prilikom stvaranja $ONOO^-$ (Förstermann i Sessa, 2012; Cyr i sar., 2020). Stoga je za formiranje kompletnije slike o međusobnoj povezanosti između NO i ROS u endotelne ćelijama neophodan drugačiji pristup koji bi podrazumevao merenje ekspresije i aktivnosti NADPH oksidaza, određivanje aktivnosti enzima uključenih u sistem antioksidativne zaštite, kao i merenje količine sintetisanog $ONOO^-$, što prevazilazi ciljeve koji su postavljeni u ovoj doktorskoj disertaciji.

Ispitivanje uticaja dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP na propustljivost jednosloja endotelne ćelije je pokazalo donekle varirajući efekat u prvim nedeljama izlaganja, da bi zatim nakon šest, i pogotovo devet nedelja izlaganja ćelija bio detektovan trend smanjenja endotelne propustljivosti. Ovaj efekat je, ipak, bio prolaznog karaktera, s obzirom na to da nakon dvanaest nedelja nisu uočene razlike u propustljivosti jednosloja EA.hy926 ćelija. Ekspresija dva proteina koji ulaze u sastav TJ, okcludina i ZO-1, je pratila promene u endotelnoj propustljivosti. Slične varijacije u funkcijskim i molekularnim odgovorima su zapazili i van der Toorn i saradnici nakon izlaganja humanih epitelne ćelije bronhija česticama iz aerosola poreklom iz proizvoda na bazi duvana u trajanju od dvanaest nedelja (van der Toorn et al., 2018). Ovakva variranja u molekularnim i funkcijskim odgovorima ćelija u uslovima *in vitro* tokom vremena nisu neobična i pretpostavlja se da odražavaju normalne fluktuacije koje se javljaju u datim odgovorima ćelija *in vivo*. S obzirom na to da studije slične našoj u potpunosti nedostaju, dobijeni rezultati mogu samo u izvesnoj meri da se uporede sa rezultatima Ahmadpour i saradnika koji su pokazali da izlaganje miševa smeši ftalata u kojoj se, između ostalog, nalazi i DBP u trajanju od šest nedelja povećava propustljivost krvno-moždane barijere i da je u osnovi tog efekta smanjena ekspresija ZO-1, ali ne i okcludina (Ahmadpour i sar., 2021). Rezultati prikazani u ovoj studiji nisu u skladu sa rezultatima ove teze, osim što obe studije potvrđuju uticaj DBP na integritet polupropustljive endotelne barijere, u čemu ulogu imaju promene u ekspresiji proteina koji ulaze u sastav TJ. Jasno je da ova i studija Ahmadpour i saradnika nisu u potpunosti uporedive zbog velikih razlika u eksperimentalnim postavkama. Neophodno je istaći da je do sada uticaj DBP na molekulske i funkcijske odgovore ćelija veoma oskudno ispitan, te je

dostupna literatura ograničena, pogotovo vezano za uticaj ovog ftalata na endotelne ćelije u uslovima *in vitro*. Zbog toga je u velikoj meri otežano poređenje rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji sa rezultatima drugih autora.

Različite hemikalije iz radnog i životnog okruženja kao što su nikotin, arsen, BPA, dioksin, trimetiltin-hlorid, perfluorooktansulfonska kiselina (pregledni rad Hu i sar., 2015), teški metali (Wei i sar., 2017; Machoń-Grecka i sar., 2022) i druge raznorodne hemikalije (Tsai i sar., 2015; Kalkunte i sar., 2017) mogu da utiču na nastanak i razvoj novih krvnih sudova, čime doprinose brojnim patološkim stanjima povezanim sa neovaskularizacijom. Međutim, ne zna se mnogo o efektima dugotrajnog izlaganja niskim koncentracijama DBP na angiogenezu u uslovima *in vitro*, te je uočena potreba za ispitivanjem uticaja ovog ftalata na sposobnost formiranja novih krvnih sudova, što može imati značajne patofiziološke posledice. S tim u vezi, u ovoj doktorskoj disertaciji je ispitan uticaj dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP u trajanju od dvanaest nedelja na sposobnost formiranja endotelne tuba u uslovima *in vitro*. Rezultati su pokazali da direktno izlaganje EA.hy926 ćelija DBP tokom dužeg vremenskog perioda dovodi do dinamičnih promena u angiogenom potencijalu EA.hy926 ćelija, što se ogleda u činjenici da je nakon tri i šest nedelja izlaganja zapažen trend smanjenog stvaranja endotelne tuba, dok je nakon devet i dvanaest nedelja izlaganja ćelija DBP uočeno povećano formiranje endotelne tuba. S obzirom na to da relevantna istraživanja angiogenog potencijala EA.hy926 ćelija nakon dugotrajnog izlaganja DBP u potpunosti nedostaju, rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji mogu se uporediti samo sa prethodno objavljenim rezultatima iz naše laboratorije, gde smo utvrdili da izlaganje EA.hy926 ćelija istim nanomolarnim koncentracijama DBP koje su korišćene u ovoj studiji (10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M) tokom četiri nedelje povećava adheziju ćelija za komponente ECM i relativnu ekspresiju gena za odabrane integrine, a smanjuje migraciju ćelija (Stanic i sar., 2022). Adhezija i migracija ćelija kroz ECM su neizostavni učesnici prilikom odvijanja procesa poput angiogeneze i očuvanja integriteta samog tkiva (Malinin i sar., 2012). Rezultati Stanic i saradnika na posredan način, preko povećane adhezije i smanjene migracije ćelija, potvrđuju zapažanja o smanjenoj angiogenezi u uslovima *in vitro* nakon prvih tri, odnosno šest nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija nanomolarnim koncentracijama DBP. Povećana angiogeneza detektovana nakon devet, a naročito nakon dvanaest nedelja izlaganja ćelija DBP je u korelaciji sa značajno povećanom koncentracijom nitrita detektovanom u navedenim nedeljama. NO ima ulogu u migraciji ćelija i angiogenezi na taj način što indukuje proširenje površine endotelne ćelija povezano sa dilatacijom, čime je omogućen pravilan odgovor na angiogene stimuluse (Lamalice i sar., 2007; Lee i sar., 2021). Migracija endotelne ćelija tokom angiogeneze pokrenuta je hemotaksijom koja uključuje VEGF, bFGF, angiopoetin-1 prisutan u tkivima oko krvnih sudova i angiopoetin-2 koji, u kombinaciji sa VEGF, stimuliše neovaskularizaciju. Smatra se da ovi faktori omogućuju endotelne ćelije da se pričvrste za ECM, a zajedno sa integrinskim receptorom za fibronektin i vitronektin predstavljaju glavne induktore u formiranju krvnih sudova (Felmeden i sar., 2003; Lamalice i sar., 2007; Lee i sar., 2021). S obzirom na to da DBP ispoljava dvojak uticaj na angiogenezu EA.hy926 ćelija, od inhibicije u prvim nedeljama izlaganja do stimulacije u kasnijim, može se pretpostaviti i da bi efekti koje bi takvo izlaganje prouzrokovalo u uslovima *in vivo* bili dvojak. Promene u angiogenom odgovoru endotelne ćelija, kako one koje dovode do prenaplašene stimulacije angiogeneze, tako i one koje dovode do inhibicije ovog procesa, mogu negativno uticati na celokupan kardiovaskularni sistem. Kada je u pitanju ateroskleroza, angiogeneza ima važnu ulogu u krvarenju unutar aterosklerotskog plaka, što za posledicu ima slabljenje strukture plaka, nestabilnost i rupturu plaka, a što dalje vodi ka akutnom koronarnom sindromu (Virmani i sar., 2005; Shoeibi i sar., 2018). Sa druge strane, neadekvatna angiogeneza je usko povezana sa smanjenim ili potpuno ograničenim protokom krvi, što vodi ka ishemijskim bolestima kao što su infarkt miokarda i moždani udar (Carmeliet, 2003; Felmeden i sar., 2003).

Gore navedeni rezultati ukazuju na to da dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP dovodi do dinamičnih promena u sposobnosti ćelija da formiraju endotelne tube u uslovima *in vitro*, te je s tim u vezi ispitan uticaj DBP na relativnu

ekspresiju gena za tri proteina ključna za proces angiogeneze: VEGF-A, VEGFR-2 i VE-kadherin. VEGF-A ima esencijalnu ulogu u formiranju krvnih sudova, s obzirom na to da povećava vaskularnu permeabilnost i stimulira proliferaciju endotelnih ćelija, a pored toga indukuje i stvaranje NO u endotelnim ćelijama tokom angiogeneze, što dodatno stimulira stvaranje novog krvnog suda (Felmeden i sar., 2003). Aktivacija VEGFR-2 na površini endotelnih ćelija stimulira ćelijsku migraciju, mitogenezu, diferencijaciju endotelnih ćelija, vaskularnu propustljivost i organizaciju krvnog suda, što stimulira angiogenezu (Felmeden i sar., 2003; Simons, 2005). VE-kadherin (CD144) pripada superfamiliji kadherina i ima ključnu ulogu u održavanju adherentnih veza između endotelnih ćelija, a samim tim je od velikog značaja za održavanje integriteta polupropustljive endotelne barijere. Pored toga, tokom embrionalnog razvoja je neophodan za organizovanje stabilnog vaskularnog sistema i održavanje novoformiranih krvnih sudova, dok kasnije tokom života inhibira nekontrolisani rast krvnih sudova, te ima važnu ulogu u angiogenezi (Giannotta i sar., 2013). Podaci prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju na to da su promene u relativnoj ekspresiji gena za VEGF-A, VEGFR-2 i VE-kadherin takođe dinamične i u skladu sa identifikovanim razlikama u pogledu angiogenog potencijala EA.hy926 ćelija nakon izlaganja odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP tokom različitih nedelja izlaganja. Ovi rezultati, zajedno sa podacima vezanim za formiranje endotelnih tuba u uslovima *in vitro*, predstavljaju nove nalaze, s obzirom na to da do danas nisu objavljeni slični podaci o uticaju dugotrajnog izlaganja DBP na angiogenezu i ekspresiju relevantnih gena u humanim makrovaskularnim endotelnim ćelijama.

5.4. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija dibutil-ftalatu

Rezultati ispitivanja efekata kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim višim koncentracijama DBP i farmakološkim inhibitorima su potvrdili neke od efekata koje DBP ispoljava u endotelnim ćelijama i podržali predložene mehanizme delovanja koji su uočeni tokom ispitivanja efekata dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP u trajanju od dvanaest nedelja, kao što su povećano vezivanje monocita za jednosloj endotelnih ćelija, smanjena endotelna propustljivost, povećan nivo NO, povećana migracija ćelija i angiogeneza.

Vezivanje U937 za jednosloj endotelnih ćelija nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija DBP je potvrdilo rezultate dugotrajnog izlaganja, što sugerira da DBP ispoljava opšti proinflamacijski uticaj na endotelne ćelije. Za razliku od dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija DBP, gde je relativna ekspresija gena za VCAM-1 povećana u skladu sa povećanim vezivanjem monocita za jednosloj endotelnih ćelija, u eksperimentima sa kratkotrajnim izlaganjem EA.hy926 ćelija DBP je relativna ekspresija gena za VCAM-1 nije bila značajno promenjena, kao ni relativna ekspresija gena za ICAM-1 i E-selektin. Kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama DBP nije imalo uticaja na relativnu ekspresiju gena za MCP-1, što nije u skladu sa rezultatima Kong i saradnika, koji su pokazali da se u osnovi povećanog vezivanja linije humanih monocita THP-1 za EA.hy926 ćelije nalazi upravo povećana ekspresija MCP-1, kako na nivou gena, tako i na nivou proteina, koji se izlučuje u medijum i zatim deluje kao hemoatraktant za vezivanje THP-1 monocita za jednosloj EA.hy926 ćelija (Kong i sar., 2022). Pored toga, u ovoj studiji je detektovana i povećana ekspresija gena za IL-8, hemokin za koji se zna da učestvuje u vezivanju monocita za endotelne ćelije (Xiong i sar., 2022), dok Kong i saradnici nisu uočili promene u relativnoj ekspresiji gena za IL-8 ni sa jednom od korišćenih koncentracija DBP (Kong i sar., 2022). Razlike između rezultata ove disertacije i rezultata objavljenih u studiji Kong i saradnika se mogu objasniti različitim koncentracijama DBP koje su indukovale vezivanje monocita za jednosloj EA.hy926 ćelija. Naime, u ovoj doktorskoj disertaciji je najizraženiji efekat na vezivanje U937 monocita zapažen nakon izlaganja EA.hy926 ćelija 10^{-4} M DBP, dok je u studiji Kong i saradnika povećano vezivanje THP-1 monocita za EA.hy926 ćelije uočeno nakon izlaganja

ćelija 10^{-8} M DBP. Moguće je da različite koncentracije DBP aktiviraju različite signalne mehanizme i prepisivanje različitih gena koji kodiraju proteine sa sličnom funkcijom u endotelnim ćelijama, što za posledicu ima učešće različitih medijatora i signalnih puteva u određenom funkcijskom odgovoru endotelnih ćelija. Uprkos evidentnim razlikama u molekulskom mehanizmu koji stoji iza vezivanja monocita za jednosloj EA.hy926 ćelija, opšti trend povećanja vezivanja monocita za endotel pod uticajem DBP je očigledan u obe studije, što implicira da bi izlaganje endotelnih ćelija DBP moglo biti okidač za nastanak endotelne disfunkcije kao prvog koraka u nastanku ateroskleroze i posledično KVB koje u osnovi imaju aterosklerotske promene u krvnim sudovima. Pored toga, u okviru ove doktorske disertacije je pokazano da DBP deluje na ovaj proces aktivacijom MAPK/ERK signalnog puta, što predstavlja novi naučni doprinos razumevanju efekata i mehanizama delovanja DBP u humanim makrovaskularnim endotelnim ćelijama.

Dok su efekti dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija nižim nanomolarnim koncentracijama DBP na adheziju i migraciju ćelija prolazni i promenljivi, kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija višim mikromolarnim koncentracijama ovog ftalata je izazvalo koordinisane funkcijske promene kada su u pitanju ova dva parametra. Naime, u grupi ćelija koje su izlagane 10^{-5} M DBP u trajanju od 24 h je detektovana smanjena adhezija ćelija za želatin i istovremeno povećana migracija. Ustanovljeno je da DBP ispoljava pozitivan efekat na migraciju EA.hy926 ćelija preko GPER i signalnih puteva MAPK/ERK i eNOS-NO. Pored toga, pokazano je da izlaganje ćelija svim ispitivanim koncentracijama DBP ne menja relativnu ekspresiju gena za MMP-2 i MMP-9, ali da se sa povećanjem koncentracije DBP povećava katalitička aktivnost MMP-2. Interesantno je da antagonist GPER i inhibitor ERK1/2 nisu poništili efekat DBP na aktivnost MMP-2, ali L-NAME jeste, čime je utvrđeno da DBP povećava aktivnost MMP-2 preko signalnog puta eNOS-NO. Kada je u pitanju ispitivanje uticaja pojedinih ftalata na migraciju endotelnih ćelija, pokazano je, na primer, da HUVEC ćelije pojačano migriraju nakon izlaganja 10^{-5} M DBP u trajanju od 48 h (Hua i sar., 2023), što je rezultat koji je u velikoj meri u saglasnosti sa prikazanim rezultatima. Sa druge strane, Kim i saradnici su pokazali da izlaganje humanih epitelnih ćelija endometrijuma 25×10^{-6} M DEHP u trajanju od 24 h povećava migraciju ćelija (Kim i sar., 2022), dok je izlaganje endotelnih ćelija humanog hemangioma 10^{-7} M DEHP i benzilbutil-ftalatu (eng. *benzyl butyl phthalate*, BBP) stimulisalo migraciju nakon 48 h izlaganja (Cui i sar., 2019). Pored toga, Tsai i saradnici su pokazali da izlaganje ćelijske linije humanog hepatocelularnog karcinoma Huh7 10^{-6} M BBP u trajanju od 24 h povećava migraciju i angiogenezu u uslovima *in vitro* (Tsai i sar., 2014).

Kada je u pitanju efekat koji DBP ispoljava na angiogenezu u uslovima *in vitro*, rezultati ovog dela doktorske disertacije ukazuju na to da kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama DBP preko ER i GPER aktivira signalne puteve MAPK/ERK, PI3K/Akt i eNOS-NO, što dalje vodi ka povećanom formiranju endotelnih tuba. Ova zapažanja predstavljaju potpuno nove nalaze, s obzirom na to da do danas nije pokazano da DBP može da ispoljava proangiogeni efekat na humane makrovaskularne endotelne ćelije, niti je definisan molekulski mehanizam preko kog DBP ispoljava navedeni efekat. Rezultati dobijeni kako nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija višim mikromolarnim koncentracijama DBP, tako i nakon dugotrajnog izlaganja ćelija nižim nanomolarnim koncentracijama DBP ukazuju na to da je angiogeneza proces na koji ovaj endokrini ometač ciljano deluje. Mehanizmi koji leže u osnovi angiogeneze u fiziološkim i patofiziološkim stanjima organizma su dobro poznati. Čitav spektar unutarćelijskih signalnih puteva je uključen u regulaciju angiogeneze, uključujući puteve koji vode ka aktivaciji malih GTPaza iz familije Rho, Akt, eNOS, SAPK2/p38, kao i signalne puteve koji su uključeni u fosforilaciju kinaze fokalne adhezije (Lamalice i sar., 2007) i ERK1/2 (Walker i sar., 2021). Međutim, nije poznato preko kojih unutarćelijskih signalnih mehanizama izlaganje hemikalijama iz radnog i životnog okruženja pokreće proces angiogeneze. Dostupni podaci iz literature ukazuju na to da mehanizmi mogu da budu raznoliki. Izlaganje ćelijske linije hepatocelularnog karcinoma Huh7 BBP povećava angiogenezu preko aktivacije signalnog puta aril-hidrokarbonskog receptora (AhR)/ERK/VEGF (Tsai i sar., 2014), dok se pozitivan efekat BPA na angiogenezu u HUVEC ćelijama ogleda u povećanju relativne ekspresije gena za nekoliko proteina

uključenih u kontrolu procesa angiogeneze, kao što su VEGFR-2, VEGFA, eNOS i koneksin 43, u povećanom stvaranju NO (Andersson i Brittebo, 2012), kao i u povećanoj ekspresiji proteina VEGF-D u humanim endotelnim ćelijama krvnih sudova endometrijuma (Helmestam i sar., 2014). Štaviše, Liu i saradnici su pokazali da akutno izlaganje endotelnih ćelija govede aorte BPA stimuliše angiogenezu preko aktivacije GPER, ali ne i ER α ili ER β , što za posledicu ima povećanje nivoa proteina inhibitora apoptoze koji je povezan sa X hromozomom (Liu i sar., 2015). Rezultati prikazani u ovom delu doktorske disertacije ukazuju na to da se angiogeneza aktivirana kratkotrajnim izlaganjem endotelnih ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama DBP može smanjiti inhibitorima Akt i ERK1/2, kao i inhibicijom sinteze NO u EA.hy926 ćelijama, što ukazuje na to da su upravo ovi signalni putevi, PI3K/Akt, MAPK/ERK i eNOS-NO, uključeni u pozitivan efekat koji DBP ispoljava na angiogenezu u EA.hy926 ćelijama. Pored toga, rezultati su pokazali da se Akt, ERK1/2 i eNOS aktiviraju nakon izlaganja ćelija DBP, i da se povećava stvaranje NO, što ide u prilog prethodnom zaključku. Rezultati istraživanja drugih autora su takođe ukazali na aktivaciju signalnih puteva MAPK/ERK, PI3K/Akt i eNOS-NO u angiogenezi nakon izlaganja različitim hemikalijama iz radnog i životnog okruženja (Andersson i Brittebo, 2012; Tsai i sar., 2014; Zárate i sar., 2020).

Dalje su ispitivani uzvodni elementi na koje deluje DBP, a koji zatim mogu da aktiviraju pomenute signalne puteve u EA.hy926 ćelijama. DBP je poznati EDC za koji je pokazano da može da interferira sa signalnim putevima koje aktiviraju estrogenski hormoni u neuronima moždane kore miševa (Wójtowicz i sar., 2017), u humanim ćelijama kancera prostate LNCaP (Lee i sar., 2014b), u humanim tumorskim ćelijama jajnika KGN koje su po svojim osobinama slične primarnim humanim granulosa ćelijama jajnika (Zhang i sar., 2022), u Lajdigovim ćelijama testisa pacova (Wakui i sar., 2014), kao i u jajnim ćelijama fetusa miša (Tu i sar., 2019). Štaviše, brojna istraživanja ukazuju na to da estrogenski hormoni direktno regulišu angiogenezu preko delovanja na endotelne ćelije. U fiziološkim uslovima je angiogeneza u materici u korelaciji sa fluktuacijama u nivou cirkulišućeg E2 i drugih steroidnih reproduktivnih hormona. U patološkim stanjima, poput raka dojke, uočena je jasna asocijacija između povećane koncentracije estrogenskih hormona u krvi, ekspresije ER u endotelnim ćelijama, angiogeneze i/ili invazivnosti tumora (pregledni rad Losordo i Isner, 2001). Sveukupno, podaci o potencijalnim estrogenskim efektima DBP i povezanosti estrogenskih signalnih puteva sa angiogenezom su naveli na ispitivanje posredstva ER u stimulaciji angiogeneze u EA.hy926 ćelijama pod uticajem DBP. Primenjeni su antagonisti ER i GPER, a zatim je ispitivan uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama DBP na aktivacionu fosforilaciju Akt, ERK1/2 i eNOS, kao i na stvaranje NO. Uočeno je da oba tipa ER, i klasični ER i GPER, učestvuju u prenosu signala od DBP na površini ćelije putevima PI3K/Akt, MAPK/ERK i eNOS-NO u EA.hy926 ćelijama. Ovo su prvi do sada objavljeni naučni rezultati koji ukazuju na povezanost između izloženosti endotelnih ćelija DBP sa klasičnim ER i GPER i tri gorepomenute nizvodne signalne kaskade. Takođe su izneti prvi dokazi o tome da DBP može da deluje preko GPER i da na taj način aktivira signalne puteve PI3K/Akt, MAPK/ERK i eNOS-NO. Nekoliko studija je pokazalo da određeni zagađivači iz radnog i životnog okruženja takođe ispoljavaju estrogenske efekte preko signalnih puteva koji se nalaze nizvodno od GPER, uključujući BPA i njegove analoge, pesticide, polibromovane difenil-etre (PBDE) i njihove metabolite hidrosilovane PBDE, organofosfatne usporivače gorenja, metale sa estrogenskim svojstvima poput kadmijuma i arsena (Qie i sar., 2021) i metabolite ftalata poput mono-2-etilheksil-ftalata koji je najzastupljeniji metabolit DEHP (Yang i sar., 2018). Međutim, prema našim saznanjima, rezultati prikazani u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju prve naučne dokaze koji ukazuju na to da DBP u EA.hy926 ćelijama ispoljava efekte preko aktivacije GPER. Kako humane makrovaskularne endotelne ćelije eksprimiraju oba tipa klasičnog ER, ER α i ER β , ali i GPER (Isensee i sar., 2009; Kim i sar., 2014a), sasvim je moguće da ovi receptori mogu da posreduju u efektima koje DBP ispoljava na nivou angiogeneze u EA.hy926 ćelijama.

Važno je istaći da tačan mehanizam kojim se DBP vezuje za ER α i ER β i time nizvodno aktivira signalne puteve još uvek nije razjašnjen. Acconcia i saradnici su utvrdili da aktivacija E2

vodi ka brznoj aktivaciji signalnih puteva koji se odvijaju van jedra – signalizacija PI3K/Akt i MAPK/ERK preko ER α , a p38-MAPK preko ER β (pregledni rad Acconcia i sar., 2015). Postoje dokazi o tome da se BPA vezuje za ER α što vodi ka fosforilaciji ERK1/2 i Akt, odnosno da deluje kao mimetik E2, dok se istovremeno ponaša kao antagonist E2 zbog toga što sprečava prenos signala sa ER β do p38-MAPK (pregledni rad Acconcia i sar., 2015). Do ovog trenutka, slični podaci za DBP ne postoje. Treba napomenuti, međutim, da su neke studije prijavile da DBP i drugi ftalati imaju potencijalno nizak afinitet za ER β , što navodi na zaključak da ftalati verovatno nisu direktni antagonisti ER β (pregledni rad Wakui i sar., 2014), dok je potvrđen relativni afinitet DBP za vezivanje ER α ($\sim 10^{-4}$) (Yiu i sar., 2014). Sudeći po ovim rezultatima, ne iznenađuje da je uloga ER u angiogenezi donekle kompleksna. Gubitak *ERA*, gena koji kodira ER α , je povezan sa povećanom angiogenezom HUVEC ćelija, što ukazuje na potencijalnu supresivnu ulogu ovog receptora u formiranju novih krvnih sudova (Likhite i sar., 2019). Sa druge strane, pokazano je da aktivacija *ERB*, gena koji kodira ER β , stimuliše angiogenezu (Chen i sar., 2017). Međutim, pokazano je da ubacivanje *ERB* u maligne ćelije inhibiše rast tih ćelija i sprečava ekspanziju tumora na taj način što inhibiše angiogenezu (Hartman i sar., 2006). Pored toga, eksperimentalno je potvrđeno da nedostatak oba tipa jedarnih ER smanjuje gustinu moždanih kapilara (Dubal i sar., 2001; Jesmin i sar., 2003). Takođe, postoje podaci o tome da aktivacija GPER smanjuje angiogenezu u trostruko negativnom raku dojke (Liang i sar., 2017). Suprotno ovome, De Francesco i saradnici su pokazali da GPER posreduje u aktivaciji signalnog puta HIF-1 α /VEGF koja je zavisna od estrogena, što zatim stimuliše angiogenezu i napredovanje raka dojke (De Francesco i sar., 2014). U svetlu ovih rezultata, uočava se jasna potreba za dodatnim istraživanjima u cilju identifikacije tačnog doprinosa oba podtipa klasičnog ER i GPER u odgovorima koje DBP indukuje u endotelnim ćelijama, uključujući i angiogenezu.

Na osnovu prikazanih rezultata se može zaključiti da molekularni mehanizam preko kog DBP ispoljava efekat na angiogenezu u EA.hy926 ćelijama uključuje ER i GPER, koji dalje aktiviraju Akt, ERK1/2 i eNOS i povećavaju sintezu NO. Ovaj mehanizam se donekle razlikuje od proangiogenog mehanizma preko kog deluju neke druge hemikalije iz radnog i životnog okruženja, poput BBP, BPA i dva pesticida, 3-hloro-4-hidroksibenzenska kiselina (CHB) i hlorspirifos (CPF) (Andersson i Brittebo, 2012; Helmestam i sar., 2014; Tsai i sar., 2014; Zárate i sar., 2020). Uzvodni receptor koji se aktivira u delovanju BBP, CHB i CPF na angiogenezu je AhR. Međutim, uloga ER kod tih hemikalija nije ispitana. Štaviše, većina pomenutih hemikalija stimuliše angiogenezu tako što povećava ekspresiju VEGF ili receptora za VEGF. U našoj studiji, nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama DBP nije detektovana povećana ekspresija gena za VEGF, što ukazuje na to da VEGF nije nužno uključen u proangiogeni efekat koji DBP ispoljava u EA.hy926 ćelijama. Važno je napomenuti da s obzirom na to da nije merena koncentracija VEGF u medijumu ćelija koje su izlagane DBP, ne može u potpunosti da se isključi mogućnost povećanog lučenja ovog proangiogenog faktora nakon izlaganja EA.hy926 ćelija DBP. Razlike između signalnog puta preko kog DBP deluje na angiogenezu i puteva koje aktiviraju druge hemikalije iz radnog i životnog okruženja mogu da se objasne razlikama u osobinama same hemikalije (npr. slične estrogenskim hormonima, agonisti AhR, i dr.), tipu ćelija, trajanju izlaganja i koncentraciji ispitivane hemikalije. U ovom delu doktorske disertacije ispitivane su proangiogene osobine DBP na kontinuiranoj liniji humanih makrovaskularnih endotelnih ćelija EA.hy926, dok su druge istraživačke grupe koristile ćelijsku liniju hepatocelularnog karcinoma Huh7 (Tsai i sar., 2014) i ćelijsku liniju adenokarcinoma dojke MCF7 (Zárate i sar., 2020). Sposobnost BPA da stimuliše angiogenezu u uslovima *in vitro* je ispitivana na HUVEC ćelijama (Andersson i Brittebo, 2012), humanim endotelnim ćelijama krvnih sudova endometrija (Helmestam i sar., 2014) i na endotelnim ćelijama goveđe aorte (Liu i sar., 2015). Moguće je da ove ćelije ne poseduju nužno iste unutarćelijske signalne puteve koji kontrolišu angiogenezu. Takođe se može primetiti da se proangiogeni mehanizam koji DBP pokreće u EA.hy926 ćelijama delimično preklapa sa proangiogenim mehanizmom preko kog deluju ksenoestrogeni. Tako, na primer, ovaj mehanizam u ćelijama raka dojke podrazumeva aktivaciju signalnih puteva PI3K/Akt i

MAPK/ERK koji su zavisni od ER (Buteau-Lozano i sar., 2008), dok u endotelnim ćelijama miševa pokreće stvaranje NO zavisno od ER (Noguchi i sar., 2002). Stoga, hemikalije iz radnog i životnog okruženja koje mogu da aktiviraju ER mogu da aktiviraju slične proangiogene signalne mehanizme u ćelijama koje su zavisne od estrogena i ti mehanizmi mogu da uključuju signalne puteve PI3K/Akt, MAPK/ERK i NOS-NO koji zavise od ER.

S obzirom na to da je u ovom delu doktorske disertacije pokazano da je angiogeneza indukovana kratkotrajnim izlaganjem EA.hy926 ćelija DBP osetljiva na inhibitore signalnih puteva PI3K/Akt, MAPK/ERK i eNOS-NO, može se izneti tvrdnja da se ove signalne kaskade ponašaju sinergistički u kontekstu povećanja angiogeneze u EA.hy926 ćelijama pod delovanjem DBP. Sadejstvo između signalnih puteva PI3K/Akt, MAPK/ERK i NOS-NO je uočeno i u drugim studijama (Wang i sar., 2019b; Ferreira-Marques i sar., 2021). Međutim, postavlja se pitanje da li su ovi signalni molekuli međusobno povezani ili predstavljaju deo zasebnih grana unutarćelijskih signalnih puteva koji kontrolišu angiogenezu u EA.hy926 ćelijama koje su izlagane DBP. Neke studije ističu da su kinaze ERK1/2, PI3K i PKB/Akt međusobno povezane u načinu delovanja. U preglednom radu Manning i Toker je istaknuto da postoji nekoliko tačaka unakrsne regulacije između signalnog puta PI3K/Akt i signalnog puta MAPK/ERK, što za posledicu ima kako recipročnu regulaciju ovih signalnih puteva, tako i konvergentnu regulaciju nizvodnih procesa (Manning i Toker, 2017). Pored toga, pokazano je da inhibitor PI3K/Akt, LY29004, smanjuje aktivaciju ERK1/2 indukovanu G-CSF (Ding i sar., 2021) i peptidnom mimetikom apolipoproteina A (Lv i sar., 2021). Sa druge strane, i da se pretpostavi da ne postoji unakrsna regulacija između PI3K/Akt i MAPK/ERK u uzvodnim delovima ovih signalnih puteva, oba signalna puta svakako imaju ulogu u regulaciji eNOS u endotelnim ćelijama. Brojne studije su pokazale da vezivanje estrogenskih hormona za ER α u endotelnim ćelijama vodi ka aktivaciji signalnih puteva PI3K/Akt i MAPK/ERK, što dalje za posledicu ima fosforilaciju eNOS na aminokiselinskom ostatku Ser1177, čime se povećava aktivnost enzima (pregledni rad Wu i sar., 2011). U svetlu ovih podataka, povećana fosforilacija eNOS i posledično stvaranje NO predstavljaju rezultat nizvodnog delovanja kinaza PI3K, PKB/Akt i ERK1/2 u linearnom signalnom putu preko kog DBP stimuliše angiogenezu u EA.hy926 ćelijama.

U ovoj doktorskoj disertaciji je prvi put pokazano da kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama DBP preko ER i GPER aktivira signalne puteve PI3K/Akt, MAPK/ERK i eNOS-NO i nadalje stimuliše angiogenezu u uslovima *in vitro*, čime je dat originalan naučni doprinos razumevanju uloge koju DBP ispoljava na nivou vaskulature. Međutim, nekoliko pitanja je još uvek ostalo otvoreno, kao što je identifikacija tačnog odnosa i mogućeg sadejstva između signalnih puteva PI3K/Akt, MAPK/ERK i eNOS-NO i specifična uloga jedarnih i membranskih ER u stimulaciji angiogeneze u EA.hy926 ćelijama pod delovanjem DBP. Eksperimentalni pristup korišćen u ovom delu doktorske disertacije ima određene nedostatke. Na prvom mestu, kratkotrajno izlaganje ćelija DBP ne odgovara u potpunosti realnoj izloženosti ljudi, pre svega jer ne uzima u obzir dugotrajno, kontinuirano izlaganje ovom ftalatu, ali i zbog brzog metabolizma DBP unutar organizma. Pored toga, činjenica je da je koncentracija DBP koja je stimulisala angiogenezu u uslovima *in vitro* znatno iznad koncentracija kojima je čovek rutinski izložen i koje se mogu izmeriti u telesnim tečnostima većine ljudi, međutim, sasvim je moguće da se ovako visoke koncentracije mogu detektovati u serumu ljudi u specifičnim okolnostima, kao što su određene medicinske intervencije, slučajno trovanje i akutna profesionalna izloženost, kada ljudi mogu kratkotrajno doći u kontakt sa visokim koncentracijama DBP. Ovi rezultati ukazuju na to da je dovoljno čak i kratkotrajno izlaganje ovakvim koncentracijama DBP da se kod osoba koje su bile izložene DBP na goreopisani način pokrenu odgovarajući molekularni i funkcijski odgovori u endotelnim ćelijama uključujući, između ostalog, migraciju endotelnih ćelija i angiogenezu. Treba istaći da izlaganje ćelija DBP ne isključuje u potpunosti mogućnost da su zabeleženi efekti zapravo posredovani MBP, odnosno da su EA.hy926 ćelije metabolisale DBP tokom eksperimenta. Međutim, u ovom trenutku može samo da se spekulira da zabeleženi efekti delimično potiču od MBP, s obzirom na to da nema eksperimentalne potvrde za ovakvu tvrdnju, i da nije moguć oslonac

na podatke iz literature vezane za metabolizam DBP u humanim endotelnim ćelijama jer ih, nažalost, nema.

6. Zaključci

Na osnovu analize rezultata dobijenih u okviru ispitivanja efekata dugotrajnog i kratkotrajnog izlaganja humane endotelne ćelijske linije EA.hy926 endokrinim ometačima BPA i DBP, a potom i diskusije dobijenih rezultata u svetlu dostupnih literaturnih podataka može se zaključiti da dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama BPA i DBP izaziva funkcijske i molekulske promene u humanim endotelnim ćelijama koje se, kada je u pitanju izlaganje ćelija DBP, mogu dovesti u vezu sa endotelnom disfunkcijom, ali ne i kada je u pitanju izlaganje ćelija BPA, za koje je pokazano da ima suprotan efekat. Pored toga, prikazani rezultati ispitivanja efekata kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim višim koncentracijama BPA i DBP se u velikoj meri podudaraju sa rezultatima dobijenim nakon dugotrajnog izlaganja ćelija nižim nanomolarnim koncentracijama i ukazuju na, do sada, nepoznate mehanizme preko kojih ovi endokrini ometači utiču na funkciju humanih endotelnih ćelija.

✚ Dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama BPA ne dovodi do endotelne disfunkcije, već do funkcijskih i molekulskih promena koje pospešuju integritet jednosloja endotelnih ćelija u uslovima *in vitro*: smanjeno vezivanje monocita za jednosloj endotelnih ćelija preko smanjenja relativne ekspresije gena za VCAM-1; poništavanje stimulišućeg efekta proinflamacijskog citokina TNF- α na vezivanje monocita; povećana adhezija za proteine ECM – želatin; smanjena migracija ćelija; smanjenje propustljivosti jednosloja endotelnih ćelija, usled povećane ekspresije proteina koji ulaze u sastav TJ – okludina i ZO-1; prolazno smanjenje nivoa ROS, uz istovremeno kontinuirano povećano stvaranje NO, koje je delimično posledica povećane ekspresije gena za eNOS; smanjenje vijabilnosti ćelija, ali tek nakon četrnaest nedelja izlaganja ovom EDC.

✚ Kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama BPA je na sličan način, kao i dugotrajno izlaganje, dovelo do nekih funkcijskih i molekulskih promena: smanjena adhezija monocita za jednosloj endotelnih ćelija, preko smanjenja relativne ekspresije gena za VCAM-1; smanjena migracija ćelija posredstvom smanjenja aktivnosti MMP-2; povećano stvaranje NO preko ER i GPER i nizvodne aktivacije signalnog puta PI3K/Akt; aktivacija oba signalna puta – PI3K/Akt i MAPK/ERK. Međutim, za razliku od rezultata dobijenih iz dugotrajnog izlaganja ćelija nižim nanomolarnim koncentracijama BPA, parametri kao što su: vijabilnost ćelija, adhezija na želatin, propustljivost jednosloja endotelnih ćelija i sinteza ROS se nisu menjali nakon kratkotrajnog izlaganja ovom EDC.

✚ Dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim nanomolarnim koncentracijama DBP ispoljava efekte koji se mogu dovesti u vezu sa endotelnom disfunkcijom u uslovima *in vitro*: prolazno smanjena vijabilnost ćelija; kontinuirano povećano vezivanje monocita za jednosloj endotelnih ćelija preko povećanja relativne ekspresije gena za VCAM-1 i E-selektin; smanjenje, a potom povećanje migracije ćelija; povećana, a potom smanjena propustljivost jednosloja endotelnih ćelija usled promene u ekspresiji proteina koji ulaze u sastav TJ – okludina i ZO-1; prolazno smanjenje nivoa ROS, uz istovremeno kontinuirano povećano stvaranje NO, koje je posledica povećane aktivacije eNOS putem PI3K/Akt; smanjenje, a zatim povećanje formiranja endotelnih tuba u uslovima *in vitro* koje je posledica promena u relativnoj ekspresiji gena za VEGFR-2, VEGF-A i VE-kadherin. Adhezija ćelija na želatin se nije menjala nakon dugotrajnog izlaganja ovom EDC.

✚ Kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama DBP je dovelo do nekih funkcijskih i molekulskih promena koje se delimično podudaraju sa rezultatima ispitivanja efekata dugotrajnog izlaganja: povećano vezivanje monocita za jednosloj endotelnih ćelija, preko povećanja relativne ekspresije gena za IL-8, kao i preko GPER i signalnog puta ERK1/2; smanjenje propustljivosti jednosloja endotelnih ćelija usled povećane ekspresije proteina koji ulaze u sastav TJ – okludina i ZO-1; smanjenje nivoa ROS; povećano stvaranje NO koje je posledica povećane aktivacije eNOS putem ER i GPER i aktivacije signalnih puteva PI3K/Akt i

MAPK/ERK; povećanje formiranja endotelnih tuba u uslovima *in vitro* putem ER i GPER i signalnih puteva PI3K/Akt, MAPK/ERK i eNOS-NO. Međutim, za razliku od rezultata dobijenih iz dugotrajnog izlaganja ćelija nižim nanomolarnim koncentracijama DBP, kratkotrajno izlaganje DBP je takođe dovelo do sledećih promena: smanjenje adhezije ćelija za želatin i istovremeno povećanje migracije EA.hy926 ćelija do koje je došlo putem GPER i signalnih puteva ERK1/2 i eNOS-NO, kao i povećane enzimske aktivnosti MMP-2 preko signalnog puta eNOS-NO. Vijabilnost ćelija se nije menjala nakon kratkotrajnog izlaganja DBP.

7. Literatura

- Acconcia, F., Pallottini, V., i Marino, M. (2015). Molecular mechanisms of action of BPA. Dose-Response, 13(4), 1559325815610582. <https://doi.org/10.1177/1559325815610582>
- Adeyemi, J. A., Ukwenya, V. O., Arowolo, O. K., i Olise, C. C. (2021). Pesticides-induced Cardiovascular Dysfunctions: Prevalence and Associated Mechanisms. Current Hypertension Reviews, 17(1), 27–34. <https://doi.org/10.2174/1573402117666210111102508>
- Adir, M., Combelles, C. M. H., Mansur, A., Ophir, L., Hourvitz, A., Orvieto, R., Dor, J., i Machtinger, R. (2017). Dibutyl phthalate impairs steroidogenesis and a subset of LH-dependent genes in cultured human mural granulosa cell *in vitro*. Reproductive Toxicology, 69, 13–18. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2016.12.007>
- Ahmadpour, D., Mhaouty-Kodja, S., i Grange-Messent, V. (2021). Disruption of the blood-brain barrier and its close environment following adult exposure to low doses of di(2-ethylhexyl)phthalate alone or in an environmental phthalate mixture in male mice. Chemosphere, 282, 131013. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131013>
- Ahn, K., Pan, S., Beningo, K., i Hupe, D. (1995). A permanent human cell line (EA.hy926) preserves the characteristics of endothelin converting enzyme from primary human umbilical vein endothelial cells. Life Sciences, 56(26), 2331–2341. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)00227-W](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)00227-W)
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., i Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. The EMBO Journal, 15(23), 6541. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb01045.x>
- Alexander, J. S., Elrod, J. W. (2002). Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation. Journal of Anatomy, 200, 561–574. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00057.x>
- Andersson, H., i Brittebo, E. (2012). Proangiogenic effects of environmentally relevant levels of bisphenol a in human primary endothelial cells. Archives of Toxicology, 86(3), 465–474. <https://doi.org/10.1007/S00204-011-0766-2>
- Arnautova, I., George, J., Kleinman, H. K., i Benton, G. (2009). The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: State of the science and the art. Angiogenesis, 12(3), 267–274. <https://doi.org/10.1007/S10456-009-9146-4>
- Arnautova, I., i Kleinman, H. K. (2010). *In vitro* angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. Nature Protocols, 5(4), 628–635. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.6>
- Arroyo, A. G., i Iruela-Arispe, M. L. (2010). Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. Cardiovascular Research, 86(2), 226–235. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq049>
- Badding, M. A., Barraj, L., Williams, A. L., Scrafford, C., i Reiss, R. (2019). CLARITY-BPA Core Study: Analysis for non-monotonic dose-responses and biological relevance. Food and Chemical Toxicology, 131, 110554. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2019.06.001>
- Baranska, P., Jerczynska, H., Pawlowska, Z., Koziolkiewicz, W., i Cierniewski, C. S. (2005). Expression of integrins and adhesive properties of human endothelial cell line EA.hy926. Cancer Genomics and Proteomics, 2(5), 265–269. PMID: 31394624
- Barczyk, M., Carracedo, S., i Gullberg, D. (2010). Integrins. Cell and Tissue Research, 339(1), 269–280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>
- Becker, B. F., Heindl, B., Kupatt, C., Zahler, S. (2000). Endothelial function and hemostasis. Zeitschrift für Kardiologie, 89, 160–167. <https://doi.org/10.1007/pl00007320>
- Becker, K., Göen, T., Seiwert, M., Conrad, A., Pick-Fuß, H., Müller, J., Wittasek, M., Schulz, C., i Kolossa-Gehring, M. (2009). GerES IV: Phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 212(6), 685–692. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2009.08.002>

- Béguin E. P., Janssen E. F. J., Hoogenboezem M., Meijer A. B., Hoogendijk A. J., van den Biggelaar M. (2020). Flow-induced Reorganization of Laminin-integrin Networks Within the Endothelial Basement Membrane Uncovered by Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 19(7), 1179–1192. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA120.001964>
- Behera, S., Pramanik, K., i Nayak, M. (2015). Recent Advancement in the Treatment of Cardiovascular Diseases: Conventional Therapy to Nanotechnology. *Current Pharmaceutical Design*, 21(30), 4479–4497. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150817104635>
- Bhatnagar, A. (2017). Environmental Determinants of Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, 121(2), 162–180. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.306458>
- Bodai, L., i Marsh, J. L. (2012). A novel target for Huntington’s disease: ERK at the crossroads of signaling: The ERK signaling pathway is implicated in Huntington’s disease and its upregulation ameliorates pathology. *BioEssays*, 34(2), 142–148. <https://doi.org/10.1002/BIES.201100116>
- Bonetti, P. O., Lerman, L. O., i Lerman, A. (2003). Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(2), 168–175. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000051384.43104.FC>
- Bouïs, D., Hospers, G. A. P., Meijer, C., Molema, G., i Mulder, N. H. (2001). Endothelium *in vitro*: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis*, 4(2), 91–102. <https://doi.org/10.1023/A:1012259529167>
- Brassea-Pérez, E., Hernández-Camacho, C. J., Labrada-Martagón, V., Vázquez-Medina, J. P., Gaxiola-Robles, R., i Zenteno-Savín, T. (2022). Oxidative stress induced by phthalates in mammals: State of the art and potential biomarkers. *Environmental Research*, 206, 112636. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2021.112636>
- Bredhult, C., Bäcklin, B. M., i Olovsson, M. (2007). Effects of some endocrine disruptors on the proliferation and viability of human endometrial endothelial cells *in vitro*. *Reproductive Toxicology*, 23(4), 550–559. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.03.006>
- Bu, S., Nguyen, H. C., Nikfarjam, S., Michels, D. C. R., Rasheed, B., Maheshkumar, S., Singh, S., i Singh, K. K. (2022). Endothelial cell-specific loss of eNOS differentially affects endothelial function. *PLOS ONE*, 17(9), e0274487. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0274487>
- Burek, M., Arias-Loza, P. A., Roewer, N., i Förster, C. Y. (2010). Claudin-5 as a novel estrogen target in vascular endothelium. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(2), 298–304. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.197582>
- Burroughs Peña, M. S., i Rollins, A. (2017). Environmental Exposures and Cardiovascular Disease: A Challenge for Health and Development in Low- and Middle-Income Countries. *Cardiology Clinics*, 35(1), 71–86. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2016.09.001>
- Buteau-Lozano, H., Velasco, G., Cristofari, M., Balaguer, P., i Perrot-Appanat, M. (2008). Xenoestrogens modulate vascular endothelial growth factor secretion in breast cancer cells through an estrogen receptor-dependent mechanism. *Journal of Endocrinology*, 196(2), 399–412. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0198>
- Cai, S., Rao, X., Ye, J., Ling, Y., Mi, S., Chen, H., Fan, C., i Li, Y. (2020). Relationship between urinary bisphenol a levels and cardiovascular diseases in the U.S. adult population, 2003–2014. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 192, 110300. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110300>
- Camaré, C., Pucelle, M., Nègre-Salvayre, A., i Salvayre, R. (2017). Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. *Redox Biology*, 12, 18–34. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.007>
- Camasão, D. B., i Mantovani, D. (2021). The mechanical characterization of blood vessels and their substitutes in the continuous quest for physiological-relevant performances. A critical review. *Materials Today Bio*, 10, 100106. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100106>
- Caporossi, L., Viganò, P., Paci, E., Capanna, S., Alteri, A., Campo, G., Pignini, D., De Rosa, M., Tranfo, G., i Papaleo, B. (2021). Female reproductive health and exposure to phthalates and

- bisphenol A: A cross sectional study. *Toxics*, 9(11), 299. <https://doi.org/10.3390/toxics9110299>
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, 9(6), 653–660. <https://doi.org/10.1038/nm0603-653>
- Carmeliet, P., i Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249–257. <https://doi.org/10.1038/35025220>
- Carpentier, G., Berndt, S., Ferratge, S., Rasband, W., Cuendet, M., Uzan, G., i Albanese, P. (2020). Angiogenesis Analyzer for ImageJ – A comparative morphometric analysis of “Endothelial Tube Formation Assay” and “Fibrin Bead Assay.” *Scientific Reports*, 10(1), 11568. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-67289-8>
- Caserta, D., Di Segni, N., Mallozzi, M., Giovanale, V., Mantovani, A., Marci, R., i Moscarini, M. (2014). Bisphenol A and the female reproductive tract: an overview of recent laboratory evidence and epidemiological studies. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12, 37. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-37>
- Caulin-Glaser, T., Watson, C. A., Pardi, R., i Bender, J. R. (1996). Effects of 17 β -estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *Journal of Clinical Investigation*, 98(1), 36–42. <https://doi.org/10.1172/JCII18774>
- Cave, A. C., Brewer, A. C., Narayanapanicker, A., Ray, R., Grieve, D. J., Walker, S., i Shah, A. M. (2006). NADPH Oxidases in Cardiovascular Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(5–6), 691–728. <https://doi.org/10.1089/ARS.2006.8.691>
- Cerutti, C., i Ridley, A. J. (2017). Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Experimental Cell Research*, 358(1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.06.003>
- Chambliss, K. L., i Shaul, P. W. (2002). Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrine Reviews*, 23(5), 665–686. <https://doi.org/10.1210/ER.2001-0045>
- Chang, W. H., Herianto, S., Lee, C. C., Hung, H., i Chen, H. L. (2021). The effects of phthalate ester exposure on human health: A review. *Science of the Total Environment*, 786, 147371. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147371>
- Chen, J., Somanath, P. R., Razorenova, O., Chen, W. S., Hay, N., Bornstein, P., i Byzova, T. V. (2005). Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability *in vivo*. *Nature Medicine*, 11(11), 1188–1196. <https://doi.org/10.1038/NM1307>
- Chen, L., Yang, Y., Zhang, L., Li, C., Coffie, J. W., Geng, X., Qiu, L., You, X., Fang, Z., Song, M., Gao, X., i Wang, H. (2017). Aucubin promotes angiogenesis via estrogen receptor beta in a mouse model of hindlimb ischemia. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 172, 149–159. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2017.07.007>
- Chen, Q., Jin, M., Yang, F., Zhu, J., Xiao, Q., i Zhang, L. (2013). Matrix metalloproteinases: Inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators of Inflammation*, 2013, 928315. <https://doi.org/10.1155/2013/928315>
- Cheng, L., Li, J., Cheng, J., i Wu, Z. (2019). Dibutyl phthalate-induced activation of ROS and ERK1/2 causes hepatic and renal damage in Kunming mice. *Human & Experimental Toxicology*, 38(8), 938–950. <https://doi.org/10.1177/0960327119843583>
- Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., i Bobryshev, Y. V. (2015). Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiologica*, 214(1), 33–50. <https://doi.org/10.1111/APHA.12466>
- Cho, S. H., Choi, Y., Kim, S. H., Kim, S. J., i Chang, J. (2017). Urinary bisphenol A versus serum bisphenol A concentration and ovarian reproductive outcomes among IVF patients: Which is a better biomarker of BPA exposure? *Molecular and Cellular Toxicology*, 13(4), 351–359. <https://doi.org/10.1007/s13273-017-0039-0>
- Clowes A. W. (2006). *The Vascular Response to Injury*. U: Colman, R. W., Marder, V. J., Clowes, A. W., George, J. N., Goldhaber, S. Z. (Urednici). *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Peto izdanje, 761–768. Lippincott Williams i Wilkins, Philadelphia, PA, USA

- Collet, S. H., Picard-Hagen, N., Viguié, C., Lacroix, M. Z., Toutain, P.-L., i Gayrard, V. (2010). Estrogenicity of Bisphenol A: A Concentration-Effect Relationship on Luteinizing Hormone Secretion in a Sensitive Model of Prepubertal Lamb. *Toxicological Sciences*, 117(1), 54–62. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFQ186>
- Colorado-Yohar, S. M., Castillo-González, A. C., Sánchez-Meca, J., Rubio-Aparicio, M., Sánchez-Rodríguez, D., Salamanca-Fernández, E., Ardanaz, E., Amiano, P., Fernández, M. F., Mendiola, J., Navarro-Mateu, F., i Chirlaque, M. D. (2021). Concentrations of bisphenol-A in adults from the general population: A systematic review and meta-analysis. *The Science of the Total Environment*, 775, 145755. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145755>
- Cong, X., i Kong, W. (2020). Endothelial tight junctions and their regulatory signaling pathways in vascular homeostasis and disease. *Cellular Signalling*, 66, 109485. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2019.109485>
- Cosselman, K. E., Navas-Acien, A., i Kaufman, J. D. (2015). Environmental factors in cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, 12(11), 627–642. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.152>
- Coulombe, P., i Meloche, S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: Structure, regulation and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, 1773(8), 1376–1387. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2006.11.001>
- Craig, Z. R., i Ziv-Gal, A. (2018). Pretty good or pretty bad? The ovary and chemicals in personal care products. *Toxicological Sciences*, 162(2), 349–360. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx285>
- Cui, S., Wang, L., Zhao, H., Lu, F., Wang, W., i Yuan, Z. (2019). Benzyl butyl phthalate (BBP) triggers the migration and invasion of hemangioma cells via upregulation of Zeb1. *Toxicology in Vitro*, 60, 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.06.013>
- Cyr, A. R., Huckaby, L. V., Shiva, S. S., i Zuckerbraun, B. S. (2020). Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Critical Care Clinics*, 36(2), 307–321. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.009>
- Czubacka, E., Czerczak, S., i Kupczewska-Dobecka, M. M. (2021). The overview of current evidence on the reproductive toxicity of dibutyl phthalate. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 34(1), 15–37. <https://doi.org/10.13075/ijom.1896.01658>
- Čejková, S., Králová-Lesná, I., i Poledne, R. (2016). Monocyte adhesion to the endothelium is an initial stage of atherosclerosis development. *Cor et Vasa*, 58(4), e419–e425. <https://doi.org/10.1016/j.crvasa.2015.08.002>
- d'Avila-Levy, C. M., Santos, A. L. S., Cuervo, P., Jesus, J. B., i Branquinha, M. H. (2012). Applications of Zymography (Substrate-SDS-PAGE) for Peptidase Screening in a Post-Genomic Era. U: Magdeldin, S. (Urednik). *Gel Electrophoresis – Advanced Techniques*. 265-288. InTech, London, UK
- Davignon, J., i Ganz, P. (2004). Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, 109(23 Suppl 1), III27-32. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000131515.03336.F8>
- Dawoud, H., i Malinski, T. (2018). A nanomedical approach to understanding the mechanism of endothelial function and dysfunction – Clinical implications. *Journal of Nanomedicine*, 2, 1006. <http://meddocsonline.org>
- De Francesco, E. M., Pellegrino, M., Santolla, M. F., Lappano, R., Ricchio, E., Abonante, S., i Maggiolini, M. (2014). GPER mediates activation of HIF1 α /VEGF signaling by estrogens. *Cancer Research*, 74(15), 4053–4064. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3590>
- De Leon, H., Boue, S., Szostak, J., Peitsch, M. C., i Hoeng, J. (2015). Systems Biology Research into Cardiovascular Disease: Contributions of Lipidomics-based Approaches to Biomarker Discovery. *Current Drug Discovery Technologies*, 12(3), 129–154. <https://doi.org/10.2174/1570163812666150702123319>

- Deanfield, J. E., Halcox, J. P., i Rabelink, T. J. (2007). Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation* 115(10), 1285–1295. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859>
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O., i Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26(22), 3279–3290. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1210421>
- Ding, J., Yang, C., Zhang, Y., Wang, J., Zhang, S., Guo, D., Yin, T., i Yang, J. (2021). M2 macrophage-derived G-CSF promotes trophoblasts EMT, invasion and migration via activating PI3K/Akt/Erk1/2 pathway to mediate normal pregnancy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(4), 2136–2147. <https://doi.org/10.1111/JCMM.16191>
- Dubal, D. B., Zhu, H., Yu, J., Rau, S. W., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., Kindy, M. S., i Wise, P. M. (2001). Estrogen receptor α , not β , is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1952–1957. <https://doi.org/10.1073/PNAS.98.4.1952>
- Dymkowska, D., Drabarek, B., Michalik, A., Nowak, N., i Zabłocki, K. (2019). TNF α stimulates NO release in EA.hy926 cells by activating the CaMKK β -AMPK-eNOS pathway. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 106, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.11.010>
- ECHA (European Chemicals Agency). Bisphenols. <https://echa.europa.eu/hot-topics/bisphenols>. Pristupljeno: 17.8.2023. godine
- Edgell, C. J. S., Haizlip, J. E., Bagnell, C. R., Packerham, J. P., Harrison, P., Wilbourn, B., i Madden, V. J. (1990). Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EA.hy926. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 26(12), 1167–1172. <https://doi.org/10.1007/BF02623694>
- Edgell, C.J. S., McDonald, C. C., i Graham, J. B. (1983). Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(12), 3734–3737. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.12.3734>
- EFSA (European Food Safety Authority). (2023). Bisphenol A in food is a health risk. <https://www.efsa.europa.eu/en/news/bisphenol-food-health-risk>. Pristupljeno: 17.8.2023. godine
- El Hadri, K., Smith, R., Duplus, E., i El Amri, C. (2022). Inflammation, Oxidative Stress, Senescence in Atherosclerosis: Thioredoxine-1 as an Emerging Therapeutic Target. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 77. <https://doi.org/10.3390/IJMS23010077>
- Endemann, D. H., i Schiffrin, E. L. (2004). Endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(8), 1983–1992. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000132474.50966.DA>
- European Commission. (2011). Bisphenol A: EU ban on baby bottles to enter into force tomorrow. https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_11_664. Pristupljeno: 17.8.2023. godine
- Fang, C., Ning, B., Waqar, A. B., Niimi, M., Li, S., Satoh, K., Shiomi, M., Ye, T., Dong, S., i Fan, J. (2014). Bisphenol A Exposure Enhances Atherosclerosis in WHHL Rabbits. *PLOS ONE*, 9(10), e110977. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0110977>
- Fang, C., Ning, B., Waqar, A. B., Niimi, M., Li, S., Satoh, K., Shiomi, M., Ye, T., Dong, S., i Fan, J. (2015). Bisphenol A exposure induces metabolic disorders and enhances atherosclerosis in hyperlipidemic rabbits. *Journal of Applied Toxicology*, 35(9), 1058–1070. <https://doi.org/10.1002/jat.3103>
- Feliers, D., i Kasinath, B. S. (2011). Erk in Kidney Diseases. *Journal of Signal Transduction*, 2011, 768512. <https://doi.org/10.1155/2011/768512>
- Felmeden, D. C., Blann, A. D., i Lip, G. Y. H. (2003). Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *European Heart Journal*, 24(7), 586–603. [https://doi.org/10.1016/S0195-668X\(02\)00635-8](https://doi.org/10.1016/S0195-668X(02)00635-8)

- Ferreira-Marques, M., Carvalho, A., Cavadas, C., i Aveleira, C. A. (2021). PI3K/AKT/MTOR and ERK1/2-MAPK signaling pathways are involved in autophagy stimulation induced by caloric restriction or caloric restriction mimetics in cortical neurons. *Aging*, 13(6), 7872–7882. <https://doi.org/10.18632/AGING.202805>
- Fisher, M. (2008). Injuries to the Vascular Endothelium: Vascular Wall and Endothelial Dysfunction. *Reviews in Neurological Diseases*, 5(Suppl. 1), S4-11. PMID: 18645570
- Fonseca, M. I., Lorigo, M., i Cairrao, E. (2022). Endocrine-Disrupting Effects of Bisphenol A on the Cardiovascular System: A Review. *Journal of Xenobiotics*, 12(3), 181–213. <https://doi.org/10.3390/jox12030015>
- Foster, P. M. D., Cattley, R. C., i Mylchreest, E. (2000). Effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on male reproductive development in the rat: implications for human risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 38(Suppl. 1), S97–99. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00128-3](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00128-3)
- Förstermann, U., i Münzel, T. (2006). Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: from Marvel to Menace. *Circulation*, 113(13), 1708–1714. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532>
- Förstermann, U., i Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 829–837. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- Franco, D., Milde, F., Klingauf, M., Orsenigo, F., Dejana, E., Poulidakos, D., Cecchini, M., Koumoutsakos, P., Ferrari, A., i Kurtcuoglu, V. (2013). Accelerated endothelial wound healing on microstructured substrates under flow. *Biomaterials*, 34(5), 1488–1497. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.007>
- Frančula-Zaninović, S., i Nola, I. A. (2018). Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease' Risk Factors. *Current Cardiology Reviews*, 14(3), 153–163. <https://doi.org/10.2174/1573403x14666180222102312>
- Fréry, N., Santonen, T., Porras, S. P., Fucic, A., Leso, V., Bousoumah, R., Duca, R. C., El Yamani, M., Kolossa-Gehring, M., Ndaw, S., Viegas, S., i Iavicoli, I. (2020). Biomonitoring of occupational exposure to phthalates: A systematic review. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 229, 113548. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113548>
- Fu, X., Xu, J., Zhang, R., i Yu, J. (2020). The association between environmental endocrine disruptors and cardiovascular diseases: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Research*, 187, 109464. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109464>
- Gao, X., i Wang, H. S. (2014). Impact of bisphenol A on the cardiovascular system - Epidemiological and experimental evidence and molecular mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(8), 8399–8413. <https://doi.org/10.3390/ijerph110808399>
- Garcia, V., i Sessa, W. C. (2019). Endothelial NOS: perspective and recent developments. *British Journal of Pharmacology*, 176(2), 189–196. <https://doi.org/10.1111/bph.14522>
- Geens, T., Bruckers, L., Covaci, A., Schoeters, G., Fierens, T., Sioen, I., Vanermen, G., Baeyens, W., Morrens, B., Loots, I., Nelen, V., de Belleaux, B. N., Larebeke, N. Van, i Hond, E. D. (2014). Determinants of bisphenol A and phthalate metabolites in urine of Flemish adolescents. *Environmental Research*, 134, 110–117. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2014.07.020>
- Genuis, S. J., Beeson, S., Lobo, R. A., i Birkholz, D. (2012). Human Elimination of Phthalate Compounds: Blood, Urine, and Sweat (BUS) Study. *The Scientific World Journal*, 2012, 615068. <https://doi.org/10.1100/2012/615068>
- Getz, G. S., i Reardon, C. A. (2012). Animal models of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(5), 1104–1115. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.237693>
- Geyer, H., Scheunert, I., i Korte, F. (1986). Bioconcentration potential of organic environmental chemicals in humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 6(4), 313–347. [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(86\)90002-4](https://doi.org/10.1016/0273-2300(86)90002-4)

- Giannotta, M., Trani, M., i Dejana, E. (2013). VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Developmental Cell*, 26(5), 441–454. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2013.08.020>
- Gimbrone, M. A., i García-Cardena, G. (2013). Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovascular Pathology*, 22(1), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2012.06.006>
- Gimbrone, M. A., i García-Cardena, G. (2016). Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation Research*, 118(4), 620–636. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>
- Gomez Ramos, M. J., Heffernan, A. L., Toms, L. M. L., Calafat, A. M., Ye, X., Hobson, P., Broomhall, S., i Mueller, J. F. (2016). Concentrations of phthalates and DINCH metabolites in pooled urine from Queensland, Australia. *Environment International*, 88, 179–186. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2015.12.016>
- González-Mariscal, L., Tapia, R., i Chamorro, D. (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(3), 729–756. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.018>
- Government of Canada. (2020). Bisphenol A (BPA). <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/home-garden-safety/bisphenol-bpa.html>. Pristupljeno: 17.8.2023. godine
- Gurevich, D. B., David, D. T., Sundararaman, A., i Patel, J. (2021). Endothelial heterogeneity in development and wound healing. *Cells*, 10(9), 2338. <https://doi.org/10.3390/cells10092338>
- Hadi, H. A. R., Carr, C. S., i Al Suwaidi, J. (2005). Endothelial Dysfunction: Cardiovascular Risk Factors, Therapy, and Outcome. *Vascular Health and Risk Management*, 1(3), 183–98. PMID: 17319104
- Hahladakis, J. N., Iacovidou, E., i Gerassimidou, S. (2023). An overview of the occurrence, fate, and human risks of the bisphenol-A present in plastic materials, components, and products. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 19(1), 45–62. <https://doi.org/10.1002/ieam.4611>
- Han, C., i Hong, Y. C. (2016). Bisphenol A, Hypertension, and Cardiovascular Diseases: Epidemiological, Laboratory, and Clinical Trial Evidence. *Current Hypertension Reports*, 18(2), 11. <https://doi.org/10.1007/S11906-015-0617-2>
- Hartman, J., Lindberg, K., Morani, A., Inzunza, J., Ström, A., i Gustafsson, J. Å. (2006). Estrogen Receptor β Inhibits Angiogenesis and Growth of T47D Breast Cancer Xenografts. *Cancer Research*, 66(23), 11207–11213. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0017>
- Hatano, N., Mori, Y., Oh-hora, M., Kosugi, A., Fujikawa, T., Nakai, N., Niwa, H., Miyazaki, J. I., Hamaoka, T., i Ogata, M. (2003). Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 8(11), 847–856. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2443.2003.00680.X>
- Haynes, M. P., Sinha, D., Russell, K. S., Collinge, M., Fulton, D., Morales-Ruiz, M., Sessa, W. C., i Bender, J. R. (2000). Membrane Estrogen Receptor Engagement Activates Endothelial Nitric Oxide Synthase via the PI3-Kinase-Akt Pathway in Human Endothelial Cells. *Circulation Research*, 87(8), 677–682. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.8.677>
- Helmestam, M., Davey, E., Stavreus-Evers, A., i Olovsson, M. (2014). Bisphenol A affects human endometrial endothelial cell angiogenic activity *in vitro*. *Reproductive Toxicology*, 46, 69–76. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2014.03.002>
- Hemmings, B. A., i Restuccia, D. F. (2012). PI3K/Akt pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), a011189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011189>
- Hennig, B., Oesterling, E., i Toborek, M. (2007). Environmental toxicity, nutrition, and gene interactions in the development of atherosclerosis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 17(2), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2006.01.003>
- Hida, K., Maishi, N., Annan, D. A., i Hida, Y. (2018). Contribution of Tumor Endothelial Cells in Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1272. <https://doi.org/10.3390/IJMS19051272>

- Högberg, J., Hanberg, A., Berglund, M., Skerfving, S., Remberger, M., Calafat, A. M., Filipsson, A. F., Jansson, B., Johansson, N., Appelgren, M., i Håkansson, H. (2008). Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environmental Health Perspectives*, 116(3), 334–339. <https://doi.org/10.1289/EHP.10788>
- Hu, Z., Brooks, S. A., Dormoy, V., Hsu, C. W., Hsu, H. Y., Lin, L. T., Massfelder, T., Kimryn Rathmell, W., Xia, M., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., Amedei, A., Brown, D. G., Prudhomme, K. R., Colacci, A. M., Hamid, R. A., Mondello, C., Raju, J., Ryan, E. P., Woodrick, J., Scovassi, A. I., Singh, N., Vaccari, M, Roy, R., Forte, S., Memeo, L., Salem, H. K., Lowe, L., Jensen, L., Bisson, W. H., i Kleinstreuer, N. (2015). Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: Focus on the cancer hallmark of tumor angiogenesis. *Carcinogenesis*, 36, Suppl 1, S184–S202. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv036>
- Hua, S., Shi, F., Xie, Z., Wu, L., Dai, M., Zhang, Y., Xu, X., Zhu, Y., i Jiang, J. (2023). Di-n-butyl phthalate induces oversecretion of vascular endothelium-derived NAP-2 and promotes epithelial-mesenchymal transition of urothelial cells in newborn hypospadias rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 256, 114892. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114892>
- Huang, S., Qi, Z., Ma, S., Li, G., Long, C., i Yu, Y. (2021). A critical review on human internal exposure of phthalate metabolites and the associated health risks. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 279, 116941. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.116941>
- Hwang, Y. P., Kim, H. G., Hien, T. T., Jeong, M. H., Jeong, T. C., i Jeong, H. G. (2011). Puerarin activates endothelial nitric oxide synthase through estrogen receptor-dependent PI3-kinase and calcium-dependent AMP-activated protein kinase. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 257(1), 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.08.017>
- Inoue, H., Kemanai, S., Sano, C., Kato, S., Yokota, H., i Iwano, H. (2016). Bisphenol A glucuronide/sulfate diconjugate in perfused liver of rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(5), 733–737. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0573>
- Isensee, J., Meoli, L., Zazzu, V., Nabzdyk, C., Witt, H., Soewarto, D., Effertz, K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Busch, D., Adler, T., De Angelis, M. H., Irgang, M., Otto, C., i Noppinger, P. R. (2009). Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in LacZ reporter mice. *Endocrinology*, 150(4), 1722–1723. <https://doi.org/10.1210/EN.2008-1488>
- Ivnitsky, J. J., Schäfer, T. V., Rejniuk, V. L., i Golovko, A. I. (2023). Endogenous humoral determinants of vascular endothelial dysfunction as triggers of acute poisoning complications. *Journal of Applied Toxicology*, 43(1), 47–65. <https://doi.org/10.1002/jat.4312>
- Jaipersad, A. S., Lip, G. Y. H., Silverman, S., i Shantsila, E. (2014). The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.09.019>
- Jalal, N., Surendranath, A. R., Pathak, J. L., Yu, S., i Chung, C. Y. (2018). Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. *Toxicology Reports*, 5, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.013>
- Jesmin, S., Hattori, Y., Sakuma, I., Liu, M. Y., Mowa, C. N., i Kitabatake, A. (2003). Estrogen deprivation and replacement modulate cerebral capillary density with vascular expression of angiogenic molecules in middle-aged female rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(2), 181–189. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000043341.09081.37>
- Ji, G., Gu, J., Guo, M., Zhou, L., Wang, Z., Shi, L., i Gu, A. (2022). A systematic comparison of the developmental vascular toxicity of bisphenol A and its alternatives *in vivo* and *in vitro*. *Chemosphere*, 291(2), 132936. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.132936>
- Johns, L. E., Cooper, G. S., Galizia, A., i Meeker, J. D. (2015). Exposure assessment issues in epidemiology studies of phthalates. *Environment International*, 85, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.08.005>

- Johnson, J. L. (2017). Metalloproteinases in atherosclerosis. *European Journal of Pharmacology*, 816, 93–106. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.007>
- Kaddar, N., Bendridi, N., Harthé, C., de Ravel, M. R., Bienvenu, A. L., Cuilleron, C. Y., Mappus, E., Pugeat, M., i Déchaud, H. (2009). Development of a radioimmunoassay for the measurement of Bisphenol A in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 645(1–2), 1–4. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2009.04.036>
- Kalkunte, S., Huang, Z., Lippe, E., Kumar, S., Robertson, L. W., i Sharma, S. (2017). Polychlorinated biphenyls target Notch/Dll and VEGF R2 in the mouse placenta and human trophoblast cell lines for their anti-angiogenic effects. *Scientific Reports*, 7, 39885. <https://doi.org/10.1038/srep39885>
- Karačonji, I. B., Jurica, S. A., Lasić, D., i Jurica, K. (2017). Facts about phthalate toxicity in humans and their occurrence in alcoholic beverages. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 68(2), 81–92. <https://doi.org/10.1515/aiht-2017-68-2951>
- Keshet, Y., i Seger, R. (2010). The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. U: Seger, R. (Urednik). *MAP Kinase Signaling Protocols. Methods in Molecular Biology*. 661, 3–38. Humana Press, Totowa, NJ, SAD
- Khurana, R., Simons, M., Martin, J. F., i Zachary, I. C. (2005). Role of angiogenesis in cardiovascular disease: A critical appraisal. *Circulation*, 112(12), 1813–1824. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.535294>
- Kim, E. K., i Choi, E. J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*, 1802(4), 396–405. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2009.12.009>
- Kim, H. G., Lim, Y. S., Hwang, S., Kim, H. Y., Moon, Y., Song, Y. J., Na, Y. J., i Yoon, S. (2022). Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Triggers Proliferation, Migration, Stemness, and Epithelial–Mesenchymal Transition in Human Endometrial and Endometriotic Epithelial Cells via the Transforming Growth Factor- β /Smad Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3938. <https://doi.org/10.3390/ijms23073938>
- Kim, K. H., Young, B. D., i Bender, J. R. (2014a). Endothelial estrogen receptor isoforms and cardiovascular disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 389(1–2), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.02.001>
- Kim, M. J., Moon, M. K., Kang, G. H., Lee, K. J., Choi, S. H., Lim, S., Oh, B. C., Park, D. J., Park, K. S., Jang, H. C., i Park, Y. J. (2014b). Chronic exposure to bisphenol A can accelerate atherosclerosis in high-fat-fed apolipoprotein E knockout mice. *Cardiovascular Toxicology*, 14(2), 120–128. <https://doi.org/10.1007/s12012-013-9235-x>
- Kleinbongard, P., Heusch, G., i Schulz, R. (2010). TNF α in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. *Pharmacology & Therapeutics*, 127(3), 295–314. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2010.05.002>
- Koch, H. M., Kolossa-Gehring, M., Schröter-Kermani, C., Angerer, J., i Brüning, T. (2012). Bisphenol A in 24 h urine and plasma samples of the German Environmental Specimen Bank from 1995 to 2009: A retrospective exposure evaluation. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 22(6), 610–616. <https://doi.org/10.1038/jes.2012.39>
- Kong, T., Liu, M., Ji, B., Bai, B., Cheng, B., Wang, C. (2019). Role of the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Signaling Pathway in Ischemia-Reperfusion Injury. *Frontiers in Physiology*, 10:1038. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01038>
- Kong, Y., Wen, Y., Cao, G., Xu, Y., Zhang, C., Tang, C., Zhang, J., i Wang, Y. (2022). Di-n-butyl phthalate promotes monocyte recruitment via miR-137-3p-SP1-MCP-1 pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 236, 113491. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113491>
- Kotlinowski, J., i Jozkowicz, A. (2016). PPAR Gamma and Angiogenesis: Endothelial Cells Perspective. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 8492353. <https://doi.org/10.1155/2016/8492353>

- Krewski, D., Acosta, D., Andersen, M., Anderson, H., Bailar, J. C., Boekelheide, K., Brent, R., Charnley, G., Cheung, V. G., Green, S., Kelsey, K. T., Kerkvliet, N. I., Li, A. A., McCray, L., Meyer, O., Patterson, R. D., Pennie, W., Scala, R. A., Solomon, G. M., Stephens, M., Yager, J., Zeise, L. (2010). Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, Critical Reviews*, 13(2–4), 51–138. <https://doi.org/10.1080/10937404.2010.483176>
- Krieter, D. H., Canaud, B., Lemke, H. D., Rodriguez, A., Morgenroth, A., von Appen, K., Dragoun, G. P., i Wanner, C. (2013). Bisphenol A in chronic kidney disease. *Artificial Organs*, 37(3), 283–290. <https://doi.org/10.1111/J.1525-1594.2012.01556.X>
- Krüger, T., Cao, Y., Kjærgaard, S. K., Knudsen, L. E., i Bonefeld-Jørgensen, E. C. (2012). Effects of phthalates on the human corneal endothelial cell line B4g12. *International Journal of Toxicology*, 31(4), 364–371. <https://doi.org/10.1177/1091581812449660>
- Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R. P., i Jung, F. (2019). Vascular endothelial cell biology: An update. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4411. <https://doi.org/10.3390/ijms20184411>
- Kundapur, R.R. (2013) Zymography: Enzymes in Action. *Science International*, 1(4), 70–75. doi: 10.5567/sciintl.2013.70.75
- Kyriakis, J. M., i Avruch, J. (2001). Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. *Physiological reviews*, 81(2), 807–869. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.807>
- LaKind, J. S., Goodman, M., i Naiman, D. Q. (2012b). Use of NHANES Data to Link Chemical Exposures to Chronic Diseases: A Cautionary Tale. *PLOS ONE*, 7(12), e51086. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0051086>
- LaKind, J. S., Levesque, J., Dumas, P., Bryan, S., Clarke, J., i Naiman, D. Q. (2012a). Comparing United States and Canadian population exposures from National Biomonitoring Surveys: Bisphenol A intake as a case study. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 22(3), 219–226. <https://doi.org/10.1038/jes.2012.1>
- Lamalice, L., Le Boeuf, F., i Huot, J. (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circulation Research*, 100(6), 782–794. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e>
- Landmesser, U., i Harrison, D. G. (2001). Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coronary Artery Disease*, 12(6), 455–461. <https://doi.org/10.1097/00019501-200109000-00004>
- Langheinrich, A. C., Sedding, D. G., Kampschulte, M., Moritz, R., Wilhelm, J., Haberbosch, W. G., Ritman, E. L., i Bohle, R. M. (2009). 3-Deazaadenosine inhibits vasa vasorum neovascularization in aortas of ApoE(-)/LDL(-) double knockout mice. *Atherosclerosis*, 202(1), 103–110. <https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2008.04.008>
- Lassègue, B., i Griendling, K. K. (2010). NADPH Oxidases: Functions and Pathologies in the Vasculature. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(4), 653–661. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.181610>
- Leber, T. M., i Balkwill, F. R. (1997). Zymography: A Single-Step Staining Method for Quantitation of Proteolytic Activity on Substrate Gels. *Analytical Biochemistry*, 249(1), 24–28. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1997.2170>
- Lechner, K., von Schacky, C., McKenzie, A. L., Worm, N., Nixdorff, U., Lechner, B., Kränkel, N., Halle, M., Krauss, R. M., i Scherr, J. (2020). Lifestyle factors and high-risk atherosclerosis: Pathways and mechanisms beyond traditional risk factors. *European Journal of Preventive Cardiology*, 27(4), 394–406. <https://doi.org/10.1177/2047487319869400>
- Lee, D. D., i Schwarz, M. A. (2020). Cell-Cell Communication Breakdown and Endothelial Dysfunction. *Critical Care Clinics*, 36(2), 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.11.001>

- Lee, H. J., Hong, Y. J., i Kim, M. (2021). Angiogenesis in chronic inflammatory skin disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 12035. <https://doi.org/10.3390/ijms222112035>
- Lee, H. R., Hwang, K. A., i Choi, K. C. (2014b). The estrogen receptor signaling pathway activated by phthalates is linked with transforming growth factor- β in the progression of LNCaP prostate cancer models. *International Journal of Oncology*, 45(2), 595–602. <https://doi.org/10.3892/IJO.2014.2460>
- Lee, M. Y., Luciano, A. K., Ackah, E., Rodriguez-Vitad, J., Bancroft, T. A., Eichmann, A., Simons, M., Kyriakides, T. R., Morales-Ruiz, M., i Sessa, W. C. (2014a). Endothelial Akt1 mediates angiogenesis by phosphorylating multiple angiogenic substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35), 12865–12870. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1408472111>
- Lee, S., Chen, T. T., Barber, C. L., Jordan, M. C., Murdock, J., Desai, S., Ferrara, N., Nagy, A., Roos, K. P., i Iruela-Arispe, M. L. (2007). Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell*, 130(4), 691–703. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.06.054>
- Lee, T. Y. J., Noria, S., Lee, J., i Gotlieb, A. I. (2001). Endothelial integrity and repair. U: Angel, A., Dhalla, N., Pierce, G., Singal, P. (Urednici). *Diabetes and Cardiovascular Disease. Advances in Experimental Medicine and Biology*. 498, 65–74. Springer, Boston, MA, SAD
- Lehmle, H. J., Liu, B., Gadogbe, M., i Bao, W. (2018). Exposure to Bisphenol A, Bisphenol F, and Bisphenol S in U.S. Adults and Children: The National Health and Nutrition Examination Survey 2013-2014. *ACS Omega*, 3(6), 6523–6532. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.8B00824>
- Lemoine, A. Y., Ledoux, S., i Larger, E. (2013). Adipose tissue angiogenesis in obesity. *Thrombosis and Haemostasis*, 110(4), 661–669. <https://doi.org/10.1160/TH13-01-0073>
- Leung, Y. K., Biesiada, J., Govindarajah, V., Ying, J., Kendler, A., Medvedovic, M., i Ho, S. M. (2020). Low-Dose Bisphenol A in a Rat Model of Endometrial Cancer: A CLARITY-BPA Study. *Environmental Health Perspectives*, 128(12), 127005. <https://doi.org/10.1289/EHP6875>
- Liang, S., Chen, Z., Jiang, G., Zhou, Y., Liu, Q., Su, Q., Wei, W., Du, J., i Wang, H. (2017). Activation of GPER suppresses migration and angiogenesis of triple negative breast cancer via inhibition of NF- κ B/IL-6 signals. *Cancer Letters*, 386, 12–23. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2016.11.003>
- Likhite, N., Yadav, V., Milliman, E. J., Sopariwala, D. H., Lorca, S., Narayana, N. P., Sheth, M., Reineke, E. L., Giguère, V., i Narkar, V. (2019). Loss of Estrogen-Related Receptor Alpha Facilitates Angiogenesis in Endothelial Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 39(5), e0041–00418. <https://doi.org/10.1128/MCB>
- Lind, L., i Lind, P. M. (2012). Can persistent organic pollutants and plastic-associated chemicals cause cardiovascular disease? *Journal of Internal Medicine*, 271(6), 537–553. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2012.02536.x>
- Liu, J., Jin, X., Zhao, N., Ye, X., i Ying, C. (2015). Bisphenol A promotes X-linked inhibitor of apoptosis protein-dependent angiogenesis via G protein-coupled estrogen receptor pathway. *Journal of Applied Toxicology*, 35(11), 1309–1317. <https://doi.org/10.1002/jat.3112>
- Liu, N., Jiang, L., Sun, X., Yao, X., Zhai, X., Liu, X., Wu, X., Bai, Y., Wang, S., i Yang, G. (2017). Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induced ROS-dependent autophagic cell death in human vascular endothelial cells. *Toxicology in Vitro*, 44, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.06.024>
- Livak, K. J., i Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- Losordo, D. W., i Isner, J. M. (2001). Estrogen and Angiogenesis A Review. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(1), 6–12. <https://doi.org/10.1161/01.atv.21.1.6>

- Loufrani, L., Retailleau, K., Bocquet, A., Dumont, O., Danker, K., Louis, H., Lacolley, P., i Henrion, D. (2008). Key role of alpha(1)beta(1)-integrin in the activation of PI3-kinase-Akt by flow (shear stress) in resistance arteries. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 294(4), 1906–1913. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00966.2006>
- Lu, X., Xu, X., Lin, Y., Zhang, Y., i Huo, X. (2018). Phthalate exposure as a risk factor for hypertension. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(21), 20550–20561. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2367-6>
- Lv, K., Kong, L., Yang, M., Zhang, L., Chu, S., Zhang, L., Yu, J., Zhong, G., Shi, Y., Wang, X., i Yang, N. (2022). An ApoA-I Mimic Peptide of 4F Promotes SDF-1 α Expression in Endothelial Cells Through PI3K/Akt/ERK/HIF-1 α Signaling Pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 760908. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.760908>
- Ma, Y., Liu, H., Wu, J., Yuan, L., Wang, Y., Du, X., Wang, R., Marwa, P. W., Petlulu, P., Chen, X., i Zhang, H. (2019). The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environmental Research*, 176, 108575. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2019.108575>
- Machoń-Grecka, A., Dobrakowski, M., Kasperczyk, A., Birkner, E., i Kasperczyk, S. (2022). Angiogenesis and lead (Pb): is there a connection? *Drug and Chemical Toxicology*, 45(2), 589–593. <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1734607>
- Malinin, N. L., Pluskota, E., i Byzova, T. V. (2012). Integrin signaling in vascular function. *Current Opinion in Hematology*, 19(3), 206–211. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3283523df0>
- Manning, B. D., i Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*, 129(7), 1261–1274. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.06.009>
- Manning, B. D., i Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 169(3), 381–405. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.04.001>
- Mariana, M., i Cairrao, E. (2020). Phthalates implications in the cardiovascular system. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 7(3), 26. <https://doi.org/10.3390/JCDD7030026>
- Mariana, M., Feiteiro, J., Verde, I., i Cairrao, E. (2016). The effects of phthalates in the cardiovascular and reproductive systems: A review. *Environment International*, 94, 758–776. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.07.004>
- Mathieu-Denoncourt, J., Wallace, S. J., de Solla, S. R., i Langlois, V. S. (2015). Plasticizer endocrine disruption: Highlighting developmental and reproductive effects in mammals and non-mammalian aquatic species. *General and Comparative Endocrinology*, 219, 74–88. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.11.003>
- Matthews, J. B., Twomey, K., i Zacharewski, T. R. (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors α and β . *Chemical Research in Toxicology*, 14(2), 149–157. <https://doi.org/10.1021/TX0001833>
- Mebratu, Y., i Tesfaigzi, Y. (2009). How ERK1/2 Activation Controls Cell Proliferation and Cell Death: Is Subcellular Localization the Answer? *Cell Cycle*, 8(8), 1168–1175. <https://doi.org/10.4161/cc.8.8.8147>
- Melzer, D., Gates, P., Osborn, N. J., Henley, W. E., Cipelli, R., Young, A., Money, C., McCormack, P., Schofield, P., Mosedale, D., Grainger, D., i Galloway, T. S. (2012a). Urinary bisphenol a concentration and angiography-defined coronary artery stenosis. *PLOS ONE*, 7(8), e43378. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0043378>
- Melzer, D., Harrie, L., Cipelli, R., Henley, W., Money, C., McCormack, P., Young, A., Guralnik, J., Ferrucci, L., Bandinelli, S., Corsi, A. M., i Galloway, T. (2011). Bisphenol A exposure is associated with *in vivo* estrogenic gene expression in adults. *Environmental Health Perspectives*, 119(12), 1788–1793. <https://doi.org/10.1289/EHP.1103809>
- Melzer, D., Osborne, N. J., Henley, W. E., Cipelli, R., Young, A., Money, C., McCormack, P., Luben, R., Khaw, K. T., Wareham, N. J., i Galloway, T. S. (2012b). Urinary bisphenol A concentration and risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women. *Circulation*, 125(12), 1482–1490. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.069153>

- Melzer, D., Rice, N. E., Lewis, C., Henley, W. E., i Galloway, T. S. (2010). Association of Urinary Bisphenol A Concentration with Heart Disease: Evidence from NHANES 2003/06. *PLOS ONE*, 5(1), e8673. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0008673>
- Mestas, J., i Ley, K. (2008). Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 18(6), 228–232. <https://doi.org/10.1016/J.TCM.2008.11.004>
- Michaelis, U. R. (2014). Mechanisms of endothelial cell migration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(21), 4131–4148. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1678-0>
- Migliaccio, S., Bimonte, V. M., Besharat, Z. M., Sabato, C., Lenzi, A., Crescioli, C., i Ferretti, E. (2022). Environmental contaminants acting as endocrine disruptors modulate atherogenic processes: New risk factors for cardiovascular diseases in women? *Biomolecules*, 12(1), 44. <https://doi.org/10.3390/biom12010044>
- Montemagno, C., i Pagès, G. (2020). Resistance to Anti-angiogenic Therapies: A Mechanism Depending on the Time of Exposure to the Drugs. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 584. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00584>
- More, S., Benford, D., Hougaard Bennekou, S., Bampidis, V., Bragard, C., Halldorsson, T., Hernandez-Jerez, A., Koutsoumanis, K., Lambré, C., Machera, K., Mullins, E., Nielsen, S. S., Schlatter, J., Schrenk, D., Turck, D., Tarazona, J., i Younes, M. (2021). Opinion on the impact of non-monotonic dose responses on EFSA's human health risk assessments. *EFSA Journal*, 19(10), e06877. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2021.6877>
- Morello, F., Perino, A., i Hirsch, E. (2008). Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovascular Research*, 82(2), 261–271. <https://doi.org/10.1093/CVR/CVN325>
- Moreno, P. R., Purushothaman, K. R., Sirol, M., Levy, A. P., i Fuster, V. (2006). Neovascularization in human atherosclerosis. *Circulation*, 113(18), 2245–2252. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.578955>
- Mu, X., Chen, X., Liu, J., Yuan, L., Wang, D., Qian, L., Qian, Y., Shen, G., Huang, Y., Li, X., Li, Y., i Lin, X. (2020). A multi-omics approach reveals molecular mechanisms by which phthalates induce cardiac defects in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 265, 113876. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2019.113876>
- Mukai, Y., Rikitake, Y., Shiojima, I., Wolfrum, S., Satoh, M., Takeshita, K., Hiroi, Y., Salomone, S., Kim, H. H., Benjamin, L. E., Walsh, K., i Liao, J. K. (2006). Decreased vascular lesion formation in mice with inducible endothelial-specific expression of protein kinase Akt. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(2), 334–343. <https://doi.org/10.1172/JCI26223>
- Mungrue, I. N., Brecht, D. S., Stewart, D. J., i Husain, M. (2003). From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiologica Scandinavica*, 179(2), 123–135. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2003.01182.x>
- Murakami, M., Nguyen, L. T., Zhang, Z. W., Moodie, K. L., Carmeliet, P., Stan, R. V., i Simons, M. (2008). The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(10), 3355–3366. <https://doi.org/10.1172/JCI35298>
- Murphy, E. i Kelly, D. P. (2011). Estrogen signaling and cardiovascular disease. *Circulation Research*, 109(6), 687–696. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.236687>
- Nachman, R. M., Hartle, J. C., Lees, P. S. J., i Groopman, J. D. (2014). Early Life Metabolism of Bisphenol A: A Systematic Review of the Literature. *Current Environmental Health Reports*, 1(1), 90–100. <https://doi.org/10.1007/s40572-013-0003-7>
- Newby, A. C. (2000). An overview of the vascular response to injury: A tribute to the late Russell Ross. *Toxicology Letters*, 112–113, 519–529. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(99\)00212-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00212-X)
- Noguchi, S., Nakatsuka, M., Asagiri, K., Habara, T., Takata, M., Konishi, H., i Kudo, T. (2002). Bisphenol A stimulates NO synthesis through a non-genomic estrogen receptor-mediated mechanism in mouse endothelial cells. *Toxicology Letters*, 135(1–2), 95–101. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00252-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00252-7)

- Nourshargh, S., i Alon, R. (2014). Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity*, 41(5), 694–707. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>
- Ohore, O. E., i Zhang, S. (2019). Endocrine disrupting effects of bisphenol A exposure and recent advances on its removal by water treatment systems. A review. *Scientific African*, 5, e00135. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00135>
- Olsén, L., Lind, L., i Lind, P. M. (2012). Associations between circulating levels of bisphenol A and phthalate metabolites and coronary risk in the elderly. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 179–183. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2012.02.023>
- Pagès, G., Guérin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P., i Pouysségur, J. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science*, 286(5443), 1374–1377. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.286.5443.1374>
- Parma, L., Baganha, F., Quax, P. H. A., i de Vries, M. R. (2017). Plaque angiogenesis and intraplaque hemorrhage in atherosclerosis. *European Journal of Pharmacology*, 816, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.04.028>
- Patten, D. A., i Shetty, S. (2018). More Than Just a Removal Service: Scavenger Receptors in Leukocyte Trafficking. *Frontiers in Immunology*, 9, 2904. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02904>
- Peng, X. D., Xu, P. Z., Chen, M. L., Hahn-Windgassen, A., Skeen, J., Jacobs, J., Sundararajan, D., Chen, W. S., Crawford, S. E., Coleman, K. G., i Hay, N. (2003). Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes and Development*, 17(11), 1352–1365. <https://doi.org/10.1101/GAD.1089403>
- Phung, T. L., Ziv, K., Dabydeen, D., Eyiah-Mensah, G., Riveros, M., Perruzzi, C., Sun, J., Monahan-Earley, R. A., Shiojima, I., Nagy, J. A., Lin, M. I., Walsh, K., Dvorak, A. M., Briscoe, D. M., Neeman, M., Sessa, W. C., Dvorak, H. F., i Benjamin, L. E. (2006). Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. *Cancer Cell*, 10(2), 159–170. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2006.07.003>
- Pivonello, C., Muscogiuri, G., Nardone, A., Garifalos, F., Provisiero, D. P., Verde, N., de Angelis, C., Conforti, A., Piscopo, M., Auriemma, R. S., Colao, A., i Pivonello, R. (2020). Bisphenol A: an emerging threat to female fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 18(1), 22. <https://doi.org/10.1186/S12958-019-0558-8>
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., i Seger, R. (2011). The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, 1813(9), 1619–1633. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2010.12.012>
- Pogrmic-Majkic, K., Samardzija, D., Fa, S., Hrubik, J., Glisic, B., Kaisarevic, S., i Andric, N. (2014). Atrazine Enhances Progesterone Production Through Activation of Multiple Signaling Pathways in FSH-Stimulated Rat Granulosa Cells: Evidence for Premature Luteinization. *Biology of Reproduction*, 91(5), 124. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.122606>
- Poredos, P., Poredos, A. V., i Gregoric, I. (2021). Endothelial Dysfunction and Its Clinical Implications. *Angiology*, 72(7), 604–615. <https://doi.org/10.1177/0003319720987752>
- Posnack, N. G. (2014). The Adverse Cardiac Effects of Di(2-ethylhexyl)phthalate and Bisphenol A. *Cardiovascular Toxicology*, 14(4), 339–357. <https://doi.org/10.1007/s12012-014-9258-y>
- Poston, R. N. (2019). Atherosclerosis: Integration of its pathogenesis as a self-perpetuating propagating inflammation: A review. *Cardiovascular Endocrinology and Metabolism*, 8(2), 51–61. <https://doi.org/10.1097/XCE.0000000000000172>
- Prins, G. S., Patisaul, H. B., Belcher, S. M., i Vandenberg, L. N. (2019). CLARITY-BPA academic laboratory studies identify consistent low-dose Bisphenol A effects on multiple organ systems. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 125(S3), 14–31. <https://doi.org/10.1111/BCPT.13125>

- Qie, Y., Qin, W., Zhao, K., Liu, C., Zhao, L., i Guo, L. H. (2021). Environmental Estrogens and Their Biological Effects through GPER Mediated Signal Pathways. *Environmental Pollution*, 278, 116826. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.116826>
- Radke, E. G., Braun, J. M., Meeker, J. D., i Cooper, G. S. (2018). Phthalate exposure and male reproductive outcomes: A systematic review of the human epidemiological evidence. *Environment International*, 121, 764–793. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.07.029>
- Ramadan, M., Cooper, B., i Posnack, N. G. (2020). Bisphenols and phthalates: Plastic chemical exposures can contribute to adverse cardiovascular health outcomes. *Birth Defects Research*, 112(17), 1362–1385. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1752>
- Rasmussen, L. M., Sen, N., Vera, J. C., Liu, X., i Craig, Z. R. (2017). Effects of in vitro exposure to dibutyl phthalate, mono-butyl phthalate, and acetyl tributyl citrate on ovarian antral follicle growth and viability. *Biology of Reproduction*, 96(5), 1105–1117. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.116.144691>
- Reddy, B. S., Rozati, R., Reddy, S., Kodampur, S., Reddy, P., i Reddy, R. (2006). High plasma concentrations of polychlorinated biphenyls and phthalate esters in women with endometriosis: A prospective case control study. *Fertility and Sterility*, 85(3), 775–779. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.08.037>
- Reinhart-King, C. A. (2008). Chapter 3 Endothelial Cell Adhesion and Migration. *Methods in Enzymology*, 443, 45–64. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)02003-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)02003-X)
- Ribeiro-Varandas, E., Pereira, H. S., Monteiro, S., Neves, E., Brito, L., Ferreira, R. B., Viegas, W., i Delgado, M. (2014). Bisphenol a disrupts transcription and decreases viability in aging vascular endothelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 15791–15805. <https://doi.org/10.3390/ijms150915791>
- Ricard, N., Scott, R. P., Booth, C. J., Velazquez, H., Cilfone, N. A., Baylon, J. L., Gulcher, J. R., Quaggin, S. E., Chittenden, T. W., i Simons, M. (2019). Endothelial ERK1/2 signaling maintains integrity of the quiescent endothelium. *The Journal of Experimental Medicine*, 216(8), 1874–1890. <https://doi.org/10.1084/JEM.20182151>
- Riggs, D. W., Yeager, R. A., i Bhatnagar, A. (2018). Defining the human envirome: An omics approach for assessing the environmental risk of cardiovascular disease. *Circulation Research*, 122(9), 1259–1275. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311230>
- Rodríguez-Carmona, Y., Cantoral, A., Trejo-Valdivia, B., Téllez-Rojo, M. M., Svensson, K., Peterson, K. E., Meeker, J. D., Schnaas, L., Solano, M., i Watkins, D. J. (2019). Phthalate Exposure During Pregnancy and Long-Term Weight Gain in Women. *Environmental Research*, 169, 26–32. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2018.10.014>
- Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66(2), 105–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis – an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*, 340(2), 115–126. <https://doi.org/10.1056/NEJM199901143400207>
- Rubinfeld, H., i Seger, R. (2005). The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Molecular Biotechnology*, 31(2), 151–174. <https://doi.org/10.1385/MB:31:2:151>
- Rutkowski, J. M., Davis, K. E., i Scherer, P. E. (2009). Mechanisms of obesity and related pathologies: The macro- and microcirculation of adipose tissue. *The FEBS Journal*, 276(20), 5738–5746. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07303.x>
- Saravanabhavan, G., Guay, M., Langlois, É., Giroux, S., Murray, J., i Haines, D. (2013). Biomonitoring of phthalate metabolites in the Canadian population through the Canadian Health Measures Survey (2007–2009). *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216(6), 652–661. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2012.12.009>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., i Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Shamhari, A., Afifah, Hamid, Z. A., Budin, S. B., Shamsudin, N. J., i Taib, I. S. (2021). Bisphenol a and its analogues deteriorate the hormones physiological function of the male reproductive

- system: A mini-review. *Biomedicines*, 9(11), 1744. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111744>
- Shankar, A., i Teppala, S. (2012). Urinary bisphenol A and hypertension in a multiethnic sample of US adults. *Journal of Environmental and Public Health*, 2012, 481641. <https://doi.org/10.1155/2012/481641>
- Shioda, T., Rosenthal, N. F., Coser, K. R., Suto, M., Phatak, M., Medvedovic, M., Carey, V. J., i Isselbacher, K. J. (2013). Expressomal approach for comprehensive analysis and visualization of ligand sensitivities of xenoestrogen responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(41), 16508–16513. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1315929110>
- Shoeibi, S., Mozdziak, P., i Mohammadi, S. (2018). Important signals regulating coronary artery angiogenesis. *Microvascular Research*, 117, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.MVR.2017.12.002>
- Silva, M. J., Barr, D. B., Reidy, J. A., Kato, K., Malek, N. A., Hodge, C. C., Hurtz, D. III, Calafat, A. M., Needham, L. L., i Brock, J. W. (2003). Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Archives of Toxicology*, 77(10), 561–567. <https://doi.org/10.1007/S00204-003-0486-3>
- Silva, M. J., Barr, D. B., Reidy, J. A., Malek, N. A., Hodge, C. C., Caudill, S. P., Brock, J. W., Needham, L. L., i Calafat, A. M. (2004). Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. *Environmental Health Perspectives*, 112(3), 331–338. <https://doi.org/10.1289/EHP.6723>
- Silva, R., D'Amico, G., Hodivala-Dilke, K. M., i Reynolds, L. E. (2008). Integrins: The keys to unlocking angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(10), 1703–1713. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.172015>
- Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D. P., Ley, K., Chin, W. W., i Liao, J. K. (2000b). Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*, 407(6803), 538–541. <https://doi.org/10.1038/35035131>
- Simoncini, T., Maffei, S., Basta, G., Barsacchi, G., Genazzani, A. R., Liao, J. K., i De Caterina, R. (2000a). Estrogens and glucocorticoids inhibit endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by different transcriptional mechanisms. *Circulation Research*, 87(1), 19–25. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.1.19>
- Simons, M. (2005). Angiogenesis: Where do we stand now? *Circulation*, 111(12), 1556–1566. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000159345.00591.8F>
- Simons, M., Gordon, E., i Claesson-Welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(10), 611–625. <https://doi.org/10.1038/NRM.2016.87>
- Singh, S., i Li, S. S. L. (2011). Phthalates: Toxicogenomics and inferred human diseases. *Genomics*, 97(3), 148–157. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2010.11.008>
- Sluiter, T. J., van Buul, J. D., Huveneers, S., Quax, P. H. A., i de Vries, M. R. (2021). Endothelial barrier function and leukocyte transmigration in atherosclerosis. *Biomedicines*, 9(4), 328. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9040328>
- Snoek-van Beurden, P.A., Von den Hoff, J.W. (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*, 38(1), 73–83. <https://doi.org/10.2144/05381RV01>
- Solár, P., Zamani, A., Kubíčková, L., Dubový, P., i Joukal, M. (2020). Choroid plexus and the blood-cerebrospinal fluid barrier in disease. *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1), 35. <https://doi.org/10.1186/S12987-020-00196-2>
- Somanath, P. R., Razorenova, O. V., Chen, J., i Byzova, T. V. (2006). Akt1 in Endothelial Cell and Angiogenesis. *Cell Cycle*, 5(5), 512-518. <https://doi.org/10.4161/CC.5.5.2538>
- Srinivasan, R., Zabuawala, T., Huang, H., Zhang, J., Gulati, P., Fernandez, S., Karlo, J. C., Landreth, G. E., Leone, G., i Ostrowski, M. C. (2009). Erk1 and Erk2 regulate endothelial

- cell proliferation and migration during mouse embryonic angiogenesis. *PLOS ONE*, 4(12), e8283. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0008283>
- Stahlhut, R. W., Welshons, W. V., i Swan, S. H. (2009). Bisphenol A Data in NHANES Suggest Longer than Expected Half-Life, Substantial Nonfood Exposure, or Both. *Environmental Health Perspectives*, 117(5), 784–789. <https://doi.org/10.1289/EHP.0800376>
- Stanic, B., Kokai, D., Markovic Filipovic, J., Samardzija Nenadov, D., Pogrmic-Majkic, K., i Andric, N. (2023). Global gene expression analysis reveals novel transcription factors associated with long-term low-level exposure of EA.hy926 human endothelial cells to bisphenol A. *Chemico-Biological Interactions*, 381, 110571. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2023.110571>
- Stanic, B., Kokai, D., Tesic, B., Fa, S., Samardzija Nenadov, D., Pogrmic-Majkic, K., i Andric, N. (2022). Integration of data from the *in vitro* long-term exposure study on human endothelial cells and the *in silico* analysis: A case of dibutyl phthalate-induced vascular dysfunction. *Toxicology Letters*, 356, 64–74. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2021.12.006>
- Stegen, S., van Gastel, N., i Carmeliet, G. (2015). Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone*, 70, 19–27. <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2014.09.017>
- Steinl, D. C., i Kaufmann, B. A. (2015). Ultrasound imaging for risk assessment in atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 9749–9769. <https://doi.org/10.3390/ijms16059749>
- Steyers, C. M., i Miller, F. J. (2014). Endothelial Dysfunction in Chronic Inflammatory Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 11324–11349. <https://doi.org/10.3390/IJMS150711324>
- Su, T. C., Hwang, J. J., Sun, C. W., i Wang, S. L. (2019a). Urinary phthalate metabolites, coronary heart disease, and atherothrombotic markers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.021>
- Su, T. C., Hwang, J. S., Torng, P. L., Wu, C., Lin, C. Y., i Sung, F. C. (2019b). Phthalate exposure increases subclinical atherosclerosis in young population. *Environmental Pollution*, 250, 586–593. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.006>
- Sui, Y., Park, S. H., Helsley, R. N., Sunkara, M., Gonzalez, F. J., Morris, A. J., i Zhou, C. (2014). Bisphenol A increases atherosclerosis in pregnane X receptor-humanized ApoE deficient mice. *Journal of the American Heart Association*, 3(2), e000492. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000492>
- Sui, Y., Park, S. H., Wang, F., i Zhou, C. (2018). Perinatal Bisphenol A Exposure Increases Atherosclerosis in Adult Male PXR-Humanized Mice. *Endocrinology*, 159(4), 1595–1608. <https://doi.org/10.1210/EN.2017-03250>
- Sun, G., i Li, Y. (2019). Exposure to DBP induces the toxicity in early development and adverse effects on cardiac development in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 218, 76–82. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.11.095>
- Teeguarden, J. G., Twaddle, N. C., Churchwell, M. I., Yang, X., Fisher, J. W., Seryak, L. M., i Doerge, D. R. (2015). 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A: Evidence against sublingual absorption following ingestion in soup. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 288(2), 131–142. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2015.01.009>
- Tesfamariam, B. (2016). Endothelial Repair and Regeneration Following Intimal Injury. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 9(2), 91–101. <https://doi.org/10.1007/s12265-016-9677-1>
- Thayer, K. A., Doerge, D. R., Hunt, D., Schurman, S. H., Twaddle, N. C., Churchwell, M. I., Garantziotis, S., Kissling, G. E., Easterling, M. R., Bucher, J. R., i Birnbaum, L. S. (2015). Pharmacokinetics of Bisphenol A in Humans Following a Single Oral Administration. *Environment International*, 83, 107–115. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2015.06.008>
- Thomas, R.S., Bahadori, T., Buckley, T.J., Cowden, J., Deisenroth, C., Dionisio, K.L., Frithsen, J.B., Grulke, C.M., Gwinn, M.R., Harrill, J.A., Higuchi, M., Houck, K.A., Hughes, M.F.,

- Hunter, E.S. III, Isaacs, K.K., Judson, R.S., Knudsen, T.B., Lambert, J.C., Linnenbrink, M., Martin, T.M., Newton, S.R., Padilla, S., Patlewicz, G., Paul-Friedman, K., Phillips, K.A., Richard, A.M., Sams, R., Shafer, T.J., Setzer, R.W., Shah, I., Simmons, J.E., Simmons, S.O., Singh, A., Sobus, J.R., Strynar, M., Swank, A., Tornero-Valez, R., Ulrich, E.M., Villeneuve, D.L., Wambaugh, J.F., Wetmore, B.A., Williams, A.J. (2019). The next generation blueprint of computational toxicology at the U.S. Environmental Protection Agency. *Toxicological Sciences*, 169(2), 317–332. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz058>
- Thomas, S. R., Witting, P. K., i Drummond, G. R. (2008). Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(10), 1713–1766. <https://doi.org/10.1089/ARS.2008.2027>
- Thor, D., Zhang, R., Anderson, L., Bose, D. D., Dubé, G. P., i Rahimian, R. (2010). Effects of 17 β -estradiol on lipopolysaccharide-induced intracellular adhesion molecule-1 mRNA expression and Ca²⁺ homeostasis alteration in human endothelial cells. *Vascular Pharmacology*, 53(5–6), 230–238. <https://doi.org/10.1016/J.VPH.2010.09.001>
- Tonini, T., Rossi, F., i Claudio, P. P. (2003). Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*, 22(42), 6549–6556. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206816>
- Touyz, R. M., i Schiffrin, E. L. (2001). Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *Journal of Hypertension*, 19(7), 1245–1254. <https://doi.org/10.1097/00004872-200107000-00009>
- Tsai, C. F., Hsieh, T. H., Lee, J. N., Hsu, C. Y., Wang, Y. C., Lai, F. J., Kuo, K. K., Wu, H. L., Tsai, E. M., i Kuo, P. L. (2014). Benzyl butyl phthalate induces migration, invasion, and angiogenesis of Huh7 hepatocellular carcinoma cells through nongenomic AhR/G-protein signaling. *BMC Cancer*, 14, 556. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-556>
- Tsai, M. J., Wang, T. N., Lin, Y. S., Kuo, P. L., Hsu, Y. L., i Huang, M. S. (2015). Aryl hydrocarbon receptor agonists upregulate VEGF secretion from bronchial epithelial cells. *Journal of Molecular Medicine*, 93(11), 1257–1269. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1304-0>
- Tsen, C. M., Liu, J. H., Yang, D. P., Chao, H. R., Chen, J. L., Chou, W. C., Ho, Y. C., i Chuang, C. Y. (2021). Study on the correlation of bisphenol A exposure, pro-inflammatory gene expression, and C-reactive protein with potential cardiovascular disease symptoms in young adults. *Environmental Science and Pollution Research International*, 28, 32580–32591. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-12805-0>
- Tu, Z., Mu, X., Chen, X., Geng, Y., Zhang, Y., Li, Q., Gao, R., Liu, T., Wang, Y., i He, J. (2019). Dibutyl phthalate exposure disrupts the progression of meiotic prophase I by interfering with homologous recombination in fetal mouse oocytes. *Environmental Pollution*, 252, 388–398. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2019.05.107>
- U.S. Food and Drug Administration. (2014). Bisphenol A (BPA): Use in Food Contact Application. <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/bisphenol-bpa-use-food-contact-application>. Pristupljeno: 17.8.2023. godine
- Ushio-Fukai, M., Alexander, R. W., Akers, M., Yin, Q. Q., Fujio, Y., Walsh, K., i Griendling, K. K. (1999). Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(32), 22699–22704. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.32.22699>
- Valdés, G., Erices, R., Chacón, C., i Corthorn, J. (2008). Angiogenic, hyperpermeability and vasodilator network in utero-placental units along pregnancy in the guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Reproductive Biology and Endocrinology*, 6, 13. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-6-13>
- van der Toorn, M., Sewer, A., Marescotti, D., Johne, S., Baumer, K., Bornand, D., Dulize, R., Merg, C., Corciulo, M., Scotti, E., Pak, C., Leroy, P., Guedj, E., Ivanov, N., Martin, F., Peitsch, M., Hoeng, J., i Luettich, K. (2018). The biological effects of long-term exposure of human bronchial epithelial cells to total particulate matter from a candidate modified-risk

- tobacco product. *Toxicology in Vitro*, 50, 95–108. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2018.02.019>
- Vandenberg, L. N. (2014). Non-Monotonic Dose Responses in Studies of Endocrine Disrupting Chemicals: Bisphenol a as a Case Study. *Dose-Response*, 12(2), 259–276. <https://doi.org/10.2203/dose-response.13-020.Vandenberg>
- Vandenberg, L. N., Chahoud, I., Heindel, J. J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F. J. R., i Schoenfelder, G. (2010). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*, 118(8), 1055–1070. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901716>
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D. H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., i Myers, J. P. (2012). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*, 33(3), 378–455. <https://doi.org/10.1210/ER.2011-1050>
- Vandenberg, L. N., Wadia, P. R., Schaeberle, C. M., Rubin, B. S., Sonnenschein, C., i Soto, A. M. (2006). The mammary gland response to estradiol: Monotonic at the cellular level, non-monotonic at the tissue-level of organization? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 101(4–5), 263–274. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2006.06.028>
- Villar-Pazos, S., Martinez-Pinna, J., Castellano-Muñoz, M., Alonso-Magdalena, P., Marroqui, L., Quesada, I., Gustafsson, J. A., i Nadal, A. (2017). Molecular mechanisms involved in the non-monotonic effect of bisphenol-a on Ca²⁺ entry in mouse pancreatic β -cells. *Scientific Reports*, 7(1), 11770. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-11995-3>
- Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Finn, A. V., Gold, H. K., Tulenko, T. N., Wrenn, S. P., i Narula, J. (2005). Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(10), 2054–2061. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000178991.71605.18>
- vom Saal, F. S. (2019). Flaws in design, execution and interpretation limit CLARITY-BPA's value for risk assessments of bisphenol A. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 125(S3), 32–43. <https://doi.org/10.1111/BCPT.13195>
- Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G. A., Filser, J. G., i Dekant, W. (2002). Metabolism and Kinetics of Bisphenol A in Humans at Low Doses Following Oral Administration. *Chemical Research in Toxicology*, 15(10), 1281–1287. <https://doi.org/10.1021/TX025548T>
- Wakui, S., Shirai, M., Motohashi, M., Mutou, T., Oyama, N., Wempe, M. F., Takahashi, H., Inomata, T., Ikegami, M., Endou, H., i Asari, M. (2014). Effects of in utero exposure to di(n-butyl) phthalate for estrogen receptors α , β , and androgen receptor of Leydig cell on rats. *Toxicologic Pathology*, 42(5), 877–887. <https://doi.org/10.1177/0192623313502879>
- Walker, A. M. N., Warmke, N., Mercer, B., Watt, N. T., Mughal, R., Smith, J., Galloway, S., Haywood, N. J., Soomro, T., Griffin, K. J., Wheatcroft, S. B., Yuldasheva, N. Y., Beech, D. J., Carmeliet, P., Kearney, M. T., i Cubbon, R. M. (2021). Endothelial Insulin Receptors Promote VEGF-A Signaling via ERK1/2 and Sprouting Angiogenesis. *Endocrinology*, 162(8), bqab104. <https://doi.org/10.1210/ENDOCR/BQAB104>
- Wang, H. B., Huang, S. H., Xu, M., Yang, J., Yang, J., Liu, M. X., Wan, C. X., Liao, H. H., Fan, D., i Tang, Q. Z. (2019b). Galangin ameliorates cardiac remodeling via the MEK1/2–ERK1/2 and PI3K–AKT pathways. *Journal of Cellular Physiology*, 234(9), 15654–15667. <https://doi.org/10.1002/JCP.28216>
- Wang, Y. (2007). Mitogen-Activated Protein Kinases in Heart Development and Diseases. *Circulation*, 116(12), 1413–1423. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679589>
- Wang, Y., Wen, Y., Xiao, P., Sun, J., Chen, M., Gu, C., Kong, Y., Gu, A., Zhang, J., i Wang, Y. (2020). Di-n-butyl phthalate promotes lipid accumulation via the miR200c-5p-ABCA1 pathway in THP-1 macrophages. *Environmental Pollution*, 264, 114723. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2020.114723>

- Wang, Y., Zhu, H., i Kannan, K. (2019a). A review of biomonitoring of phthalate exposures. *Toxics*, 7(2), 21. <https://doi.org/10.3390/TOXICS7020021>
- Wei, T., Jia, J., Wada, Y., Kapron, C. M., i Liu, J. (2017). Dose dependent effects of cadmium on tumor angiogenesis. *Oncotarget*, 8(27), 44944–44959. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16572>
- Wells, E. M., Jackson, L. W., i Koontz, M. B. (2013). Decline in urinary bisphenol a concentrations in the United States. *Epidemiology*, 24(1), 167–168. <https://doi.org/10.1097/EDE.0B013E31827849B4>
- Wetherill, Y. B., Akingbemi, B. T., Kanno, J., McLachlan, J. A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C. S., Zoeller, R. T., i Belcher, S. M. (2007). *In vitro* molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 178–198. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2007.05.010>
- Wetherill, Y. B., Petre, C. E., Monk, K. R., Puga, A., i Knudsen, K. E. (2002). The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(7), 515–524. PMID: 12479269
- Wiberg, B., Lind, P. M., i Lind, L. (2014). Serum levels of monobenzylphthalate (MBzP) is related to carotid atherosclerosis in the elderly. *Environmental Research*, 133, 348–352. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2014.06.009>
- Wilck, N., i Ludwig, A. (2014). Targeting the ubiquitin-proteasome system in atherosclerosis: status quo, challenges, and perspectives. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(17), 2344–2363. <https://doi.org/10.1089/ARS.2013.5805>
- Woollard, K. J., i Geissmann, F. (2010). Monocytes in atherosclerosis: Subsets and functions. *Nature Reviews Cardiology*, 7(2), 77–86. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2009.228>
- World Health Organization. (2021). Cardiovascular diseases (CVDs). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Pristupljeno: 17.8.2023. godine
- Wortzel, I., i Seger, R. (2011). The ERK cascade: Distinct functions within various subcellular organelles. *Genes and Cancer*, 2(3), 195–209. <https://doi.org/10.1177/1947601911407328>
- Wozniak, A. L., Bulayeva, N. N., i Watson, C. S. (2005). Xenoestrogens at Picomolar to Nanomolar Concentrations Trigger Membrane Estrogen Receptor- α -Mediated Ca^{2+} Fluxes and Prolactin Release in GH3/B6 Pituitary Tumor Cells. *Environmental Health Perspectives*, 113(4), 431–439. <https://doi.org/10.1289/EHP.7505>
- Wójtowicz, A. K., Szychowski, K. A., Wnuk, A., i Kajta, M. (2017). Dibutyl Phthalate (DBP)-Induced Apoptosis and Neurotoxicity are Mediated via the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) but not by Estrogen Receptor Alpha (ER α), Estrogen Receptor Beta (ER β), or Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) in Mouse Cortical Neurons. *Neurotoxicity Research*, 31(1), 77–89. <https://doi.org/10.1007/S12640-016-9665-X>
- Wu, Q., Chambliss, K., Umetani, M., Mineo, C., i Shaul, P. W. (2011). Non-nuclear estrogen receptor signaling in the endothelium. *Journal of Biological Chemistry*, 286(17), 14737–14743. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.191791>
- Xie, F., Chen, X., Weng, S., Xia, T., Sun, X., Luo, T., i Li, P. (2019a). Effects of two environmental endocrine disruptors di-n-butyl phthalate (DBP) and mono-n-butyl phthalate (MBP) on human sperm functions in vitro. *Reproductive Toxicology*, 83, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2018.10.011>
- Xie, X., Deng, T., Duan, J., Ding, S., Yuan, J., i Chen, M. (2019b). Comparing the effects of diethylhexyl phthalate and dibutyl phthalate exposure on hypertension in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.067>
- Xiong, X., Liao, X., Qiu, S., Xu, H., Zhang, S., Wang, S., Ai, J., i Yang, L. (2022). CXCL8 in Tumor Biology and Its Implications for Clinical Translation. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 723846. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.723846>
- Xu, F., Wang, X., Wu, N., He, S., Yi, W., Xiang, S., Zhang, P., Xie, X., i Ying, C. (2017). Bisphenol A induces proliferative effects on both breast cancer cells and vascular

- endothelial cells through a shared GPER-dependent pathway in hypoxia. *Environmental Pollution*, 231, 1609–1620. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.069>
- Yang, W., Tan, W., Zheng, J., Zhang, B., Li, H., i Li, X. (2018). MEHP promotes the proliferation of cervical cancer via GPER mediated activation of Akt. *European Journal of Pharmacology*, 824, 11–16. <https://doi.org/10.1016/J.EJP.2018.01.040>
- Ye, L., Martin, T. A., Parr, C., Harrison, G. M., Mansel, R. E., i Jiang, W. G. (2003). Biphasic effects of 17- β -estradiol on expression of occludin and transendothelial resistance and paracellular permeability in human vascular endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 196(2), 362–369. <https://doi.org/10.1002/JCP.10315>
- Yiu, K. W., Lee, C. K., Kwok, K. C., i Cheung, N. H. (2014). Measuring the kinetics of the binding of xenoestrogens and estrogen receptor alpha by fluorescence polarization. *Environmental Science and Technology*, 48(19), 11591–11599. <https://doi.org/10.1021/es503801c>
- Yoon, S., i Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*, 24(1), 21–44. <https://doi.org/10.1080/02699050500284218>
- Zassadowski, F., Rochette-Egly, C., Chomienne, C., i Cassinat, B. (2012). Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway. *Cellular Signalling*, 24(12), 2369–2377. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2012.08.003>
- Zárate, L. V., Pontillo, C. A., Español, A., Miret, N. V., Chiappini, F., Cocca, C., Álvarez, L., de Pisarev, D. K., Sales, M. E., i Randi, A. S. (2020). Angiogenesis signaling in breast cancer models is induced by hexachlorobenzene and chlorpyrifos, pesticide ligands of the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 401, 115093. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2020.115093>
- Zhang, J., Zhou, K., Cheng, R., Yang, M., Shen, X., Luo, X., i Xu, L. (2022). Maternal Perinatal Exposure to Dibutyl Phthalate Promotes Ovarian Dysfunction in Adult Female Offspring via Downregulation of TGF- β 2 and TGF- β 3. *Reproductive Sciences*, 29(8), 2401–2413. <https://doi.org/10.1007/S43032-021-00785-Y>
- Zhang, S. H., Shen, Y. X., Li, L., Fan, T. T., Wang, Y., i Wei, N. (2018). Phthalate exposure and high blood pressure in adults: a cross-sectional study in China. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(16), 15934–15942. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1845-1>
- Zhang, Y., Li, P., Gao, Q., Simoncini, T., Fu, X. (2015). 2-Methoxyestradiol prevents monocyte adhesion to vascular endothelial cells via downregulation of VCAM-1 expression. *Gynecological Endocrinology*. 32(7):571-576. <https://doi.org/10.3109/09513590.2016.1141880>
- Zhao, Y., Vanhoutte, P. M., i Leung, S. W. S. (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*, 129(2), 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002>
- Zhou, Y., Ma, T., Yan, M., Meng, X., Wu, J., Ding, J., Han, X., i Li, D. (2020). Exposure of DBP in gestation induces inflammation of testicular Sertoli cells in progeny by activating NLRP3 inflammasomes. *The Science of the Total Environment*, 707, 136139. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.136139>
- Zhu, Y., Xian, X., Wang, Z., Bi, Y., Chen, Q., Han, X., Tang, D., i Chen, R. (2018). Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation. *Biomolecules*, 8(3), 80. <https://doi.org/10.3390/biom8030080>

8. Prilozi

Prilog A

6/30/25, 9:30 PM

RightsLink Printable License

WOLTERS KLUWER HEALTH, INC. LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jun 30, 2025

This Agreement between Dunja Kokai, Faculty of Biology, University of Belgrade ("You") and Wolters Kluwer Health, Inc. ("Wolters Kluwer Health, Inc.") consists of your license details and the terms and conditions provided by Wolters Kluwer Health, Inc. and Copyright Clearance Center.

License Number	6058940060800
License date	Jun 30, 2025
Licensed Content Publisher	Wolters Kluwer Health, Inc.
Licensed Content Publication	Circulation Research
Licensed Content Title	Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis
Licensed Content Author	Michael A. Gimbrone, Guillermo García-Cardena
Licensed Content Date	Feb 19, 2016
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/College
Sponsorship	No Sponsorship
Format	Print and electronic
Will this be posted online?	Yes, on a secure website

Portion	Figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Author of this Wolters Kluwer article	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Intend to modify/change the content	No
Title of new work	IMPACT OF IN VITRO EXPOSURE TO ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS BISPHENOL A AND DIBUTYL PHTHALATE ON THE FUNCTION OF HUMAN ENDOTHELIAL CELLS
Institution name	Faculty of Biology, University of Belgrade
Expected presentation date	Aug 2025
Portions	Figure 1. Endothelial-derived nitric oxide: production and biological actions; on page 623.
The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Dunja Kokai, Faculty of Biology, University of Belgrade
Specific Languages	Serbian
Requestor Location	Ms. Dunja Kokai Student square 16 Belgrade, 11000 Serbia

Publisher Tax ID	13-2932696
Billing Type	Invoice
Billing Address	Ms. Dunja Kokai Student square 16 Belgrade, Serbia 11000
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

Wolters Kluwer Health Inc. Terms and Conditions

1. **Duration of License:** Permission is granted for a one time use only. Rights herein do not apply to future reproductions, editions, revisions, or other derivative works. This permission shall be effective as of the date of execution by the parties for the maximum period of 12 months and should be renewed after the term expires.
 - i. When content is to be republished in a book or journal the validity of this agreement should be the life of the book edition or journal issue.
 - ii. When content is licensed for use on a website, internet, intranet, or any publicly accessible site (not including a journal or book), you agree to remove the material from such site after 12 months, or request to renew your permission license
2. **Credit Line:** A credit line must be prominently placed and include: For book content: the author(s), title of book, edition, copyright holder, year of publication; For journal content: the author(s), titles of article, title of journal, volume number, issue number, inclusive pages and website URL to the journal page; If a journal is published by a learned society the credit line must include the details of that society.
3. **Warranties:** The requestor warrants that the material shall not be used in any manner which may be considered derogatory to the title, content, authors of the material, or to Wolters Kluwer Health, Inc.
4. **Indemnity:** You hereby indemnify and hold harmless Wolters Kluwer Health, Inc. and its respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims, costs, proceeding or demands arising out of your unauthorized use of the Licensed Material
5. **Geographical Scope:** Permission granted is non-exclusive and is valid throughout the world in the English language and the languages specified in the license.
6. **Copy of Content:** Wolters Kluwer Health, Inc. cannot supply the requestor with the original artwork, high-resolution images, electronic files or a clean copy of content.
7. **Validity:** Permission is valid if the borrowed material is original to a Wolters Kluwer Health, Inc. imprint (J.B Lippincott, Lippincott-Raven Publishers, Williams & Wilkins, Lea & Febiger, Harwal, Rapid Science, Little Brown & Company, Harper & Row Medical, American Journal of Nursing Co, and Urban &

- Schwarzenberg - English Language, Raven Press, Paul Hoeber, Springhouse, Ovid), and the Anatomical Chart Company
8. **Third Party Material:** This permission does not apply to content that is credited to publications other than Wolters Kluwer Health, Inc. or its Societies. For images credited to non-Wolters Kluwer Health, Inc. books or journals, you must obtain permission from the source referenced in the figure or table legend or credit line before making any use of the image(s), table(s) or other content.
 9. **Adaptations:** Adaptations are protected by copyright. For images that have been adapted, permission must be sought from the rightsholder of the original material and the rightsholder of the adapted material.
 10. **Modifications:** Wolters Kluwer Health, Inc. material is not permitted to be modified or adapted without written approval from Wolters Kluwer Health, Inc. with the exception of text size or color. The adaptation should be credited as follows: Adapted with permission from Wolters Kluwer Health, Inc.: [the author(s), title of book, edition, copyright holder, year of publication] or [the author(s), titles of article, title of journal, volume number, issue number, inclusive pages and website URL to the journal page].
 11. **Full Text Articles:** Reproduction of full articles in English is prohibited.
 12. **Branding and Marketing:** No drug name, trade name, drug logo, or trade logo can be included on the same page as material borrowed from *Diseases of the Colon & Rectum*, *Plastic Reconstructive Surgery*, *Obstetrics & Gynecology (The Green Journal)*, *Critical Care Medicine*, *Pediatric Critical Care Medicine*, *the American Heart Association publications* and *the American Academy of Neurology publications*.
 13. **Open Access:** Unless you are publishing content under the same Creative Commons license, the following statement must be added when reprinting material in Open Access journals: "The Creative Commons license does not apply to this content. Use of the material in any format is prohibited without written permission from the publisher, Wolters Kluwer Health, Inc. Please contact permissions@lww.com for further information."
 14. **Translations:** The following disclaimer must appear on all translated copies: Wolters Kluwer Health, Inc. and its Societies take no responsibility for the accuracy of the translation from the published English original and are not liable for any errors which may occur.
 15. **Published Ahead of Print (PAP):** Articles in the PAP stage of publication can be cited using the online publication date and the unique DOI number.
 - i. Disclaimer: Articles appearing in the PAP section have been peer-reviewed and accepted for publication in the relevant journal and posted online before print publication. Articles appearing as PAP may contain statements, opinions, and information that have errors in facts, figures, or interpretation. Any final changes in manuscripts will be made at the time of print publication and will be reflected in the final electronic version of the issue. Accordingly, Wolters Kluwer Health, Inc., the editors, authors and their respective employees are not responsible or liable for the use of any such inaccurate or misleading data, opinion or information contained in the articles in this section.
 16. **Termination of Contract:** Wolters Kluwer Health, Inc. must be notified within 90 days of the original license date if you opt not to use the requested material.
 17. **Waived Permission Fee:** Permission fees that have been waived are not subject to future waivers, including similar requests or renewing a license.
 18. **Contingent on payment:** You may exercise these rights licensed immediately upon issuance of the license, however until full payment is received either by the publisher or our authorized vendor, this license is not valid. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed

automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of Wolters Kluwer Health, Inc.'s other billing and payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

19. **STM Signatories Only:** Any permission granted for a particular edition will apply to subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and do not involve the separate exploitation of the permitted illustrations or excerpts. Please view: [STM Permissions Guidelines](#)
20. **Warranties and Obligations:** LICENSOR further represents and warrants that, to the best of its knowledge and belief, LICENSEE's contemplated use of the Content as represented to LICENSOR does not infringe any valid rights to any third party.
21. **Breach:** If LICENSEE fails to comply with any provisions of this agreement, LICENSOR may serve written notice of breach of LICENSEE and, unless such breach is fully cured within fifteen (15) days from the receipt of notice by LICENSEE, LICENSOR may thereupon, at its option, serve notice of cancellation on LICENSEE, whereupon this Agreement shall immediately terminate.
22. **Assignment:** License conveyed hereunder by the LICENSOR shall not be assigned or granted in any manner conveyed to any third party by the LICENSEE without the consent in writing to the LICENSOR.
23. **Governing Law:** The laws of The State of New York shall govern interpretation of this Agreement and all rights and liabilities arising hereunder.
24. **Unlawful:** If any provision of this Agreement shall be found unlawful or otherwise legally unenforceable, all other conditions and provisions of this Agreement shall remain in full force and effect.

For Copyright Clearance Center / RightsLink Only:

1. **Service Description for Content Services:** Subject to these terms of use, any terms set forth on the particular order, and payment of the applicable fee, you may make the following uses of the ordered materials:
 - i. **Content Rental:** You may access and view a single electronic copy of the materials ordered for the time period designated at the time the order is placed. Access to the materials will be provided through a dedicated content viewer or other portal, and access will be discontinued upon expiration of the designated time period. An order for Content Rental does not include any rights to print, download, save, create additional copies, to distribute or to reuse in any way the full text or parts of the materials.
 - ii. **Content Purchase:** You may access and download a single electronic copy of the materials ordered. Copies will be provided by email or by such other means as publisher may make available from time to time. An order for Content Purchase does not include any rights to create additional copies or to distribute copies of the materials

Other Terms and Conditions:

v1.18

Questions? customercare@copyright.com.



Prilog B

3/3/25, 1:29 PM

RightsLink Printable License

MARY ANN LIEBERT, INC. LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Mar 03, 2025

This Agreement between Dunja Kokai, Faculty of Biology, University of Belgrade ("You") and Mary Ann Liebert, Inc. ("Mary Ann Liebert, Inc.") consists of your license details and the terms and conditions provided by Mary Ann Liebert, Inc. and Copyright Clearance Center.

License Number	5981291348381
License date	Mar 03, 2025
Licensed Content Publisher	Mary Ann Liebert, Inc.
Licensed Content Publication	Antioxidants & Redox Signaling
Licensed Content Title	Targeting the Ubiquitin-Proteasome System in Atherosclerosis: Status Quo, Challenges, and Perspectives
Licensed Content Author	Nicola Wilck, Antje Ludwig
Licensed Content Date	Dec 10, 2014
Licensed Content Volume	21
Licensed Content Issue	17
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	academic

Format	print and electronic
Portion	figures/tables
Number of figures/tables	1
Distribution quantity	5
Title of new work	IMPACT OF IN VITRO EXPOSURE TO ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS BISPHENOL A AND DIBUTYL PHTHALATE ON THE FUNCTION OF HUMAN ENDOTHELIAL CELLS
Institution name	Faculty of Biology, University of Belgrade
Expected presentation date	Aug 2025
Portions	FIG. 1. Schematic overview of key mechanisms of atherosclerosis in an evolving atherosclerotic plaque.
The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Dunja Kokai, Faculty of Biology, University of Belgrade
Requestor Location	Ms. Dunja Kokai Student square 16 Belgrade, 11000 Serbia
Billing Type	Invoice
Billing Address	Ms. Dunja Kokai Student square 16 Belgrade, Serbia 11000
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

Mary Ann Liebert, Inc. publishers Terms and Conditions

1. Introduction

The publisher for this copyrighted material is Mary Ann Liebert, Inc. publishers. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <https://myaccount.copyright.com>).

2. Limited License

Publisher hereby grants to you a non-exclusive license to use this material. Licenses are for one-time use only with a maximum distribution equal to the number that you identified in the licensing process and any electronic posting is limited to the period committed to at the time of purchase.

3. Geographic Rights: Scope

Licenses may be exercised anywhere in the world.

4. Jurisdiction:

This agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the state of New York, without giving effect to any principles of conflicts of law. If any provision of this agreement shall be unlawful, void, or for any reason unenforceable, then that provision shall be deemed severable from this agreement and shall not affect the validity and enforceability of any remaining provisions. This is the entire agreement between the parties relating to the subject matter herein and shall not be modified except in writing, signed by both parties.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted

You may not alter or modify the material in any manner without the explicit approval of the Publisher.

6. Reservation of Rights

Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

7. License Contingent on Payment

While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of

these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

8. Copyright Notice: Disclaimer

You must include the following copyright and permission notice in connection with any reproduction of the licensed material: "The publisher for this copyrighted material is Mary Ann Liebert, Inc. publishers."

9. Warranties: None

Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material and adopts on its own behalf the limitations and disclaimers established by CCC on its behalf in its Billing and Payment terms and conditions for this licensing transaction.

10. Indemnity

You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License

This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing

This license may not be amended except in writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms

Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

Special Terms:

v1.1

Questions? customercare@copyright.com.

Prilog C

3/5/25, 8:57 AM

University of Belgrade - Faculty of Biology пошта - FW: CSHL Press Reprint Permission Request Form



Dunja Kokai <m3005_2017@stud.bio.bg.ac.rs>

FW: CSHL Press Reprint Permission Request Form

1 порука

Brown, Carol <brown@cshl.edu>

3. март 2025. 16:45

Kome: "m3005_2017@stud.bio.bg.ac.rs" <m3005_2017@stud.bio.bg.ac.rs>

Permission is granted for the use of Figure 2 in the article detailed below in your PhD thesis only. Please include complete reference and copyright to Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Best wishes for success with your thesis,

Carol C. Brown
Books Development, Marketing and Sales
Cold Spring Harbor Laboratory Press
500 Sunnyside Blvd.
Woodbury NY 11797
brown@cshl.edu
516 422 4038 ph.
516 422 4095 fx

-----Original Message-----

From: reprint@cshlpress.org <reprint@cshlpress.org>

Sent: Monday, March 3, 2025 6:41 AM

To: Reprint <Reprint@cshl.edu>

Subject: CSHL Press Reprint Permission Request Form

Default Intro

Default Intro - line2

Name: Dunja Kokai

CompanyInstitution: University of Belgrade, Faculty of Biology

Library Address: Student square 16

Library Address (line 2):

City: Belgrade

State (US and Canada):

Country: Serbia

Zip: 11000

Title: Ms.

Lab/Department:

Phone: 0381659910925

Fax:

Email: m3005_2017@stud.bio.bg.ac.rs

Title of Publication: IMPACT OF IN VITRO EXPOSURE TO ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS BISPHENOL A AND DIBUTYL PHTHALATE ON THE FUNCTION OF HUMAN ENDOTHELIAL CELLS

Authors/Editors: Dunja Kokai

Date of Publication:

Publisher: University of Belgrade

Title of CSHLP Journal/Book: Cold Spring Harbor Perspectives in Biology

Title of Article/Chapter: PI3K-PKB/Akt pathway

CSHL Authors/Editors: Brian A. Hemmings and David F. Restuccia

Page Numbers: 1-3

Figure Numbers: Figure 2.

Figure Page Numbers: 2

Copyright Date: 3/3/2025

Language: Serbian

Territory:

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=608a5db00b&view=pt&search=all&permthid=thread-f:1825588346903761634&simpl=msg-f:1825588346903761634> 1/2

3/5/25, 8:57 AM

University of Belgrade - Faculty of Biology пошта - FW: CSHL Press Reprint Permission Request Form

Format: print and electronic

Additional comments: This figure will be used for my Doctoral Dissertation and for no other purpose.

ipaddress: 172.071.154.027

Default Footer

Default Footer - line2

Sent from cshlpress.com

Disclaimer

The information contained in this communication from the sender is confidential. It is intended solely for use by the recipient and others authorized to receive it. If you are not the recipient, you are hereby notified that any disclosure, copying, distribution or taking action in relation of the contents of this information is strictly prohibited and may be unlawful.

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=608a5db00b&view=pt&search=all&permthid=thread-f:1825588346903761634&simpl=msg-f:1825588346903761634> 2/2

Prilog D

3/3/25, 1:30 PM

RightsLink Printable License

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Mar 03, 2025

This Agreement between Dunja Kokai, Faculty of Biology, University of Belgrade ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5981300662557
License date	Mar 03, 2025
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	British Journal of Pharmacology
Licensed Content Title	Endothelial NOS: perspective and recent developments
Licensed Content Author	William C Sessa, Victor Garcia
Licensed Content Date	Dec 9, 2018
Licensed Content Volume	176
Licensed Content Issue	2
Licensed Content Pages	8
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic

<https://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=52665191-ebd5-4e33-bc66-d23dd806fabd>

1/6

Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title of new work	IMPACT OF IN VITRO EXPOSURE TO ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS BISPHENOL A AND DIBUTYL PHTHALATE ON THE FUNCTION OF HUMAN ENDOTHELIAL CELLS
Institution name	Faculty of Biology, University of Belgrade
Expected presentation date	Aug 2025
Portions	Figure 1. Diagram illustrating the various phosphorylation sites (stimulatory and inhibitory) located in human eNOS.
The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Dunja Kokai, Faculty of Biology, University of Belgrade
Specific Languages	Serbian
Requestor Location	Ms. Dunja Kokai Student square 16 Belgrade, 11000 Serbia
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the [STM Permissions Guidelines](#) only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts**, You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other

person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.

- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License](#) (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com.

Biografija

Dunja Kokai je rođena 25. septembra 1991. godine u Subotici gde je završila osnovnu i srednju školu. Smer Diplomirani biolog, modul Molekularni biolog, je na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu upisala 2010. godine, a završila 2014. godine sa prosečnom ocenom 8,79. Master studije, smer Master biolog, modul Molekularni biolog, na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu je upisala iste godine. Master studije je završila 2015. godine odbranom master rada pod nazivom: „DNK barkoding vrsta familije Syrphidae (Diptera: Insecta) regiona Isparta, Turska“ pod mentorstvom dr Dragane Obreht, vanrednog profesora, sa prosečnom ocenom 10,00.

Doktorske akademske studije, smer Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota, je upisala na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2017. godine. Od 2018. godine je zaposlena na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, u zvanju istraživač-pripravnik, a potom od 2021. godine u zvanju istraživač-saradnik. Doktorsku disertaciju je uradila pod mentorstvom dr Bojane Stanić, višeg naučnog saradnika, u sklopu Programa Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija kojim se finansira nauka u naučnoistraživačkim organizacijama u Srbiji.

Dunja Kokai je objavila deset radova u časopisima međunarodnog značaja, od kojih je objavila četiri kao prvi autor, jedan kao jedini prvi autor i tri sa deljenim prvim autorstvom, i devetnaest saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Дуња Кокаи _____

Број индекса _____ м3005/2017 _____

Изјављујем

Да је докторска дисертација под насловом

Утицај ендокриних ометача, бисфенола А и дибутил-фталата, на функцију хуманих
ендотелних ћелија у условима *in vitro*

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Дуња Кокаи _____

Број индекса _____ м3005/2017 _____

Студијски програм _____ Молекуларна биологија, модул Молекуларна биологија еукариота _____

Наслов рада _____ Утицај ендокриних ометача, бисфенола А и дибутил-фталата, на функцију _____
_____ хуманих ендотелних ћелија у условима *in vitro* _____

Ментори _____ др Бојана Станић, виши научни сарадник, Универзитет у Новом Саду – _____
_____ Природно-математички факултет; и _____

_____ др Јелена Ђорђевић, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај ендокриних ометача, бисфенола А и дибутил-фталата, на функцију хуманих
ендотелних ћелија у условима *in vitro*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.