

Utjecaj okoliša na epigenom u trudnoći

Antolović, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:163519>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-29**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Antonija Antolović

Utjecaj okoliša na epigenom u trudnoći

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ane Katušić Bojanac i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2018./2019.

POPIS KRATICA KORIŠTENIH U RADU

| | |
|--|--|
| DNA deoksiribonukleinska kiselina | ALSPAC Avon longitudinalna studija roditelja i djece |
| DNMT DNA metiltransferaza | FASD fetalni alkoholni spektar poremećaja |
| IUGR intrauterini zastoj rasta | FAS fetalni alkoholni sindrom |
| DOHaD teorija razvojnog podrijetla zdravlja i bolesti | HFD dijeta bogata masnoćama |
| CpG dinukleotid citozina i gvanina | SZO/WHO Svjetska zdravstvena organizacija |
| MBP protein koji veže metilnu skupinu | IPCS Internacionalni program za kemijsku sigurnost |
| H histonski protein | BPA bisfenol-A |
| ADP adenozin difosfat | ER estrogenski receptor |
| HAT histonska acetilaza | DDT diklor-difenil-trikloretran |
| HDAC histonska deacetilaza | DDE diklor-difenil-dikloretilen |
| Lys lizin | CHAMACOS Centar za procjenu zdravlja majki i djece Salinasa |
| RNA ribonukleinska kiselina | DEHP di(2-etilheksil) ftalat |
| ncRNA nekodirajuće RNA | LMW niska molekularna masa |
| lncRNA duge nekodirajuće RNA | DBP dibutil ftalat |
| miRNA mikro RNA | As arsen |
| mRNA glasnička RNA | iAs anorganska smjesa arsena |
| circRNA kružna RNA | Pb olovo |
| RISC RNA induciran utišavajući kompleks | Hg živa |
| DMR diferencijalno metilirana regija | |
| ICR kontrolna regija za genomski utisak | |
| pb parovi baza | |
| PTM posttranslacijska modifikacija | |
| LOI gubitak utiska | |
| ES embrionalne matične stanice | |
| CGI CpG otok | |
| PGC primordijalne spolne stanice | |
| EDC endokrini disruptor | |
| MTSE majčina izloženost duhanskom dimu | |
| BMI indeks tjelesne mase | |

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| SAŽETAK | i |
| SUMMARY | ii |
| 1. UVOD | 1 |
| 2. EPIGENETSKI MEHANIZMI | 3 |
| 2.1. DNA metilacija..... | 3 |
| 2.2. Histonska modifikacija | 4 |
| 2.3. Nekodirajuće RNA | 5 |
| 2.3.1. Mikro RNA | 5 |
| 2.3.2. LncRNA | 5 |
| 2.3.3. Kružna RNA..... | 6 |
| 2.3.4. Spermalna RNA | 6 |
| 3. EPIGENETIČKI DOGAĐAJI U TRUDNOĆI | 7 |
| 3.1. Važnost epigenetike u nastanku i razvoju zametka | 7 |
| 3.2. Inaktivacija X kromosoma..... | 7 |
| 3.3. Genomski utisak | 7 |
| 3.4. Trudnoća..... | 9 |
| 3.4.1. Demetilacija u zigoti i PGC | 9 |
| 3.4.2. Remetilacija..... | 10 |
| 4. FAKTORI KOJI MIJENJAJU EPIGENOM | 12 |
| 4.1. Navike..... | 12 |
| 4.1.1. Pušenje | 12 |
| 4.1.2. Alkohol..... | 13 |
| 4.1.3. Stres | 16 |
| 4.1.4. Fizička aktivnost | 16 |
| 4.1.5. Prehrana..... | 16 |
| 4.1.6. Lijekovi | 17 |
| 4.2. Okolišni čimbenici..... | 18 |
| 4.2.1. Endokrini disruptori | 18 |
| 4.2.2. Metali | 21 |
| 4.2.3. Ionizirajuće zračenje | 22 |
| 5. TRANSGENERACIJSKI OBRAZAC EPIGENETSKOG NASLJEĐIVANJA | 23 |
| 5.1. Dokazi..... | 24 |

| | | |
|-----------|---------------------------|-----------|
| 5.1.1. | Metaboličke bolesti | 24 |
| 5.1.2. | Stres | 25 |
| 5.1.3. | Endokrini disruptori..... | 26 |
| 5.1.4. | Obogaćeni okoliši..... | 27 |
| 6. | ZAKLJUČAK | 28 |
| 7. | ZAHVALE..... | 29 |
| 8. | LITERATURA..... | 30 |
| 9. | ŽIVOTOPIS | 40 |

SAŽETAK

UTJECAJ OKOLIŠA NA EPIGENOM U TRUDNOĆI

Antonija Antolović

Fetalno razdoblje ključni je period za oblikovanje obrazaca DNA metilacije i genske ekspresije. Ono predstavlja kritičnu točku u razvoju pošto epigenetske modifikacije nastale tada mogu perzistirati kasnije u životu i predstavljati rizični faktor za razvoj bolesti kasnije u životu. Najčešća epigenetska modifikacija je metilacija DNA, a slijede ju modifikacija histona te posredovanje nekodirajućih RNA. Te promjene igraju ključnu ulogu u regulaciji genskih funkcija, ali ne mijenjaju DNA sekvencu i nastaju pod utjecajem okolišnih čimbenika kojima je izložena majka te njenih navika u trudnoći (na primjer konzumacija alkohola, izloženost duhanskom dimu, uzimanje lijekova tokom trudnoće itd.). Iako u trudnoći dolazi do globalnog brisanja metilacijskih obrazaca (demetilacije) u spolnim stanicama, znamo da je moguće nasljeđivanje epigenetskih modifikacija. U potomaka F1 i F2 generacije radi se zapravo o posrednoj izloženosti okolišnim čimbenicima, a u ovom preglednom radu razmatra se mogućnost transgeneracijskog nasljeđivanja u pravom smislu, tj. mogućnost da potomak koji nije izložen nekom okolišnom čimbeniku naslijedi epigenetske promjene koje nastaju u jedinki izloženih istome.

KLJUČNE RIJEČI: epigenetika, epigenetski mehanizmi, demetilacija, remetilacija, okolišni čimbenici, transgeneracijsko nasljeđivanje

SUMMARY

ENVIRONMENTAL EFFECTS ON THE EPIGENOME IN PREGNANCY

Antonija Antolović

DNA methylation patterns and gene expression are formed during fetal development therefore making this period the crucial point for epigenetic modifications to occur and persist through life and later on lead to development of disease. Epigenetic modifications are enzyme-mediated chemical modifications of DNA which play key roles in regulating gene functions without altering the primary DNA sequence. The most common one is DNA methylation followed by histone modification and non-coding RNAs which occur whilst the mother being exposed to environmental factors and due to her habits during pregnancy (for example alcohol abuse, exposure to tobacco smoke, taking medications during pregnancy, etc). Although global demethylation in leads to loss of methylation patterns, inheritance of epigenetic modifications remains possible due to indirect exposure to environmental factors of the F1 and F2 generation. The following thesis contemplates the possibility of transgenerational inheritance of epigenetic changes from indirectly exposed to the non-exposed offspring.

KEYWORDS: epigenetics, epigenetic mechanisms, demethylation, remethylation, environmental factors, transgenerational inheritance

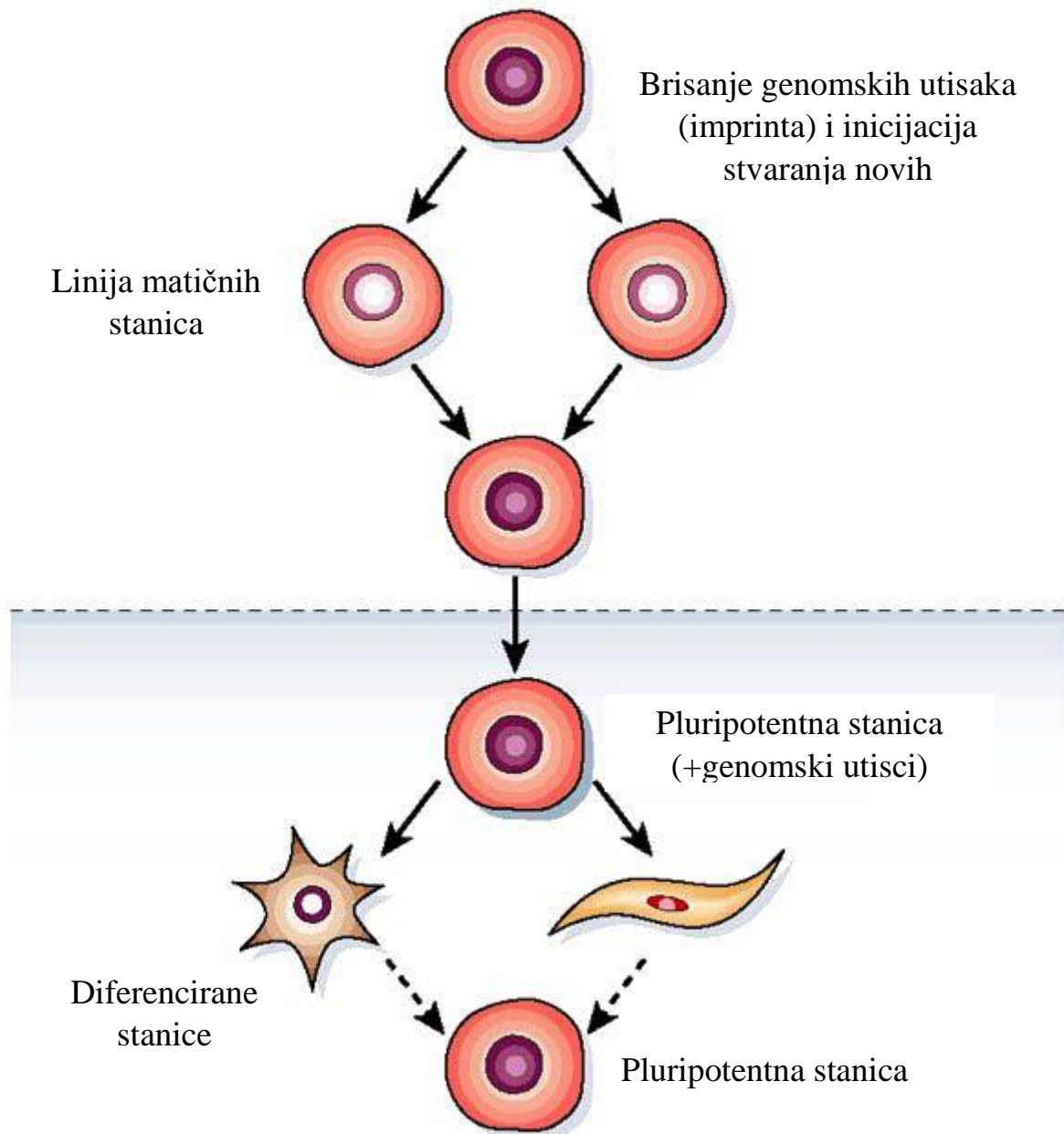
1. UVOD

Sposobnost reprodukcije temeljno je obilježje svih živih bića. Svi organizmi nasljeđuju genetičku informaciju od svojih roditelja te upravo ona određuje njihovu strukturu i funkciju. Molekula DNA nositelj je te genetičke informacije (1).

Pojam „epigenetika“ (grč. *epigenesis* – „iznad gena“) skovao je 1942. godine Conrad Waddington kako bi ukazao na „granu biologije koja proučava uzročne interakcije između gena i njihovih produkata koje dovode fenotip u bivanje“ (2). Biologija definira epigenetiku kao granu koja proučava mitotički ili mejotički nasljedne promjene genske ekspresije ili staničnog fenotipa (3). Definicija koju je napisao Waddington upotrijebljena je za opisivanje kako se stanice koje sadržavaju isti genetički materijal mogu razviti u različite tipove stanica (različite fenotipove) tijekom razvoja organizma (4). Naime, svaka stanica u jednom organizmu ima isti genom, nosi istu genetičku informaciju kodiranu DNA nukleotidima, ali te stanice imaju različite funkcije i nije neophodno da, za normalno funkcioniranje organizma, svaka od njih eksprimira sve gene. Zbog toga možemo reći da u organizmu imamo jednu DNA, tj. jedan genom, ali u različitim stanicama imamo različito modeliranu tu istu DNA koju tada nazivamo epigenomom (*Slika 1.*).

Fetalno je razdoblje vremenski okvir u kojemu se uspostavljaju ključni obrasci DNA metilacije i genske ekspresije te stoga predstavlja kritičnu točku u razvoju s obzirom da se smatra kako epigenetičke modifikacije u tom razdoblju diferenciranja brojnih stanica i tkiva mogu perzistirati kasnije u odrasloj dobi i utjecati na susceptibilnost za bolest te biti temeljem samog razvoja različitih bolesti, od raka do neurorazvojnih bolesti. Dokazi da izlaganja tijekom prenatalnog perioda mogu rezultirati epigenetskim alteracijama podržavaju teoriju razvojnog podrijetla zdravlja i bolesti (eng. DOHaD-Developmental Origins of Health and Disease) (5). Ovu hipotezu originalno je predložio epidemiolog David Barker (Barkerova hipoteza, hipoteza o štedljivom fenotipu) 1990. godine. On u hipotezi navodi kako su intrauterini zastoj rasta (eng. intrauterine growth restriction, IUGR), niska porođajna masa i prematuritet uzročno-posljedično povezani s hipertenzijom, koronarnom bolešću srca i dijabetesom tipa 2 koji se razvijaju u srednjim godinama. Barkerova je hipoteza izvedena iz povijesne kohortne studije koja je pokazala značajnu povezanost pojavnosti hipertenzije i koronarne bolesti u odrasloj dobi s prematuritetom ili niskom rodnom masom (6).

Epigenetika uvjetovana okolišem proizlazi iz ideje da okoliš i epigenom mogu promijeniti fenotip i biti povezane sa susceptibilnošću za bolest, a najvažnije je da se mogu prenositi kroz generacije (7). Zna se da je moguć intergeneracijski prijenos epigenetskih promjena, no pitanje koje nam se nameće je: Postoji li mogućnost za transgeneracijski prijenos epigenetskih promjena?



Slika 1. Sve stanice u tijelu sadrže isti set gena, no njihov fenotip varira ovisno o ekspresiji pojedinih i represiji drugih, za funkcioniranje pojedine stanice nepotrebnih, gena. Alteracije u genskoj ekspresiji bez promjene DNA sekvence nazivaju se epigenetskim promjenama. Prema: Surani, Figure 1 (8).

2. EPIGENETSKI MEHANIZMI

Epigenetski markeri kemijske su promjene DNA i njoj pridruženih histona, a upravljane su od strane enzima. Te promjene igraju ključnu ulogu u regulaciji genskih funkcija, ali ne mijenjaju primarnu DNA sekvencu te se vjerno prenose kroz mnoge generacije stanica utječući na transkripciju te mnoge druge funkcijske aspekte kromatina (9). Inducirajući promjene u genskoj ekspresiji bez promjene DNA sekvence, epigenetski mehanizmi utječu na stanični fenotip (10).

Tri su glavna mehanizma koja sudjeluju u epigenetskim modifikacijama: DNA metilacija, histonska modifikacija te posttranskripcijska regulacija genske ekspresije pomoću nekodirajućih RNA molekula (ncRNA) (4). Ove modifikacije mogu međusobno utjecati jedna na drugu. Rezultati znanstvenih studija predlažu da postoji veza između DNA metilacije i histonske modifikacije i to u mjestu njihova djelovanja (11). Zajedno ovi epigenetički regulatori kontroliraju kada i koliko će se pojedini geni eksprimirati, a samim time kontroliraju i stanične i fiziološke funkcije (5).

2.1. DNA METILACIJA

Kao prva otkrivena, DNA metilacija postala je jedan od najviše proučavanih (9) te stoga i najbolje znanih epigenetskih mehanizama u sisavaca. Ona je zapravo jedan od glavnih epigenetskih događaja u humanom genomu (7) te promjena obrazaca metilacije DNA u ključnim elementima gena poput promotora i pojačivača može imati bitan utjecaj na samu funkciju pojedinog gena (9). Iz toga proizlazi da je metilacija jako bitan regulator transkripcijske aktivnosti, genomskog imprintinga, razvoja i tumorigeneze (7).

DNA metilacija tradicionalno se smatrala relativno stabilnom modifikacijom, ali zapravo se radi o veoma dinamičnoj modifikaciji reguliranoj metiltransferazama i iterativnim demetilirajućim enzimima (iterativni enzimi kataliziraju brojne reakcije na različitim mjestima supstrata (12)) (4). Metilacija se sastoji od dodavanja metilne skupine na ugljikov atom na položaju 5 u citozinskom prstenu kako bi nastao 5-metilcitozin (5mC). To je postreplikacijska modifikacija koja se pojavljuje neuniformno u humanom genomu (7). Metilacija predominantno nastaje na citozinskim nukleotidima koji prethode gvaninima u lancu DNA, to jest u CpG dinukleotidima (1) te je u kralješnjaka 70-80% CpG dinukleotida metilirano, posebno u transkripcijski inaktivnom (represiranom) heterokromatinu te repetitivnim sekvencama poput retrotranspozona. Ti su dinukleotidi asimetrično podijeljeni u CpG-siromašne te CpG-bogate regije (7). Regije bogate CpG dinukleotidima također se nazivaju CpG otocima i smještene su u blizini promotora. Metiliranjem tih otoka dolazi do inhibicije transkripcije gena jer metilacija interferira s vezanjem nekih transkripcijskih aktivatora (1) te promovira vezanje proteina koji vežu metilnu skupinu (eng. methyl binding proteins, MBPs) i posljedično dovodi do regrutiranja transkripcijskih represora (7) koji se specifično vežu na metiliranu DNA (1).

Metilacija može biti katalizirana pomoću dvije skupine DNA metiltransferaza (DNMT). U prvu skupinu spada DNMT1 koja ima esencijalnu ulogu u proliferaciji stanica pošto osigurava održavanje DNA-metilacijskih obrazaca tijekom replikacije DNA. Druga skupina obuhvaća DNMT3A i DNMT3B koji su potrebni za *de novo* metilaciju i formaciju novih metilacijskih obrazaca u ranih embrija i tijekom razvoja. Njihova je aktivnost također potrebna u održavanju metilacijskih obrazaca u somatskih stanica (7). Kofaktor DNMT3L (eng. DNA methyltransferase 3 like), koji regrutira DNMT3A i B, također je potreban za *de novo* metilaciju u spolnih stanica (13). U novije vrijeme identificirana je još jedna metiltransferaza, DNMT3C, koja vrši ulogu medijatora za metilaciju transpozona u muškim matičnim stanicama (14).

Genetskom analizom raznih DNMT-a ustanovljeno je da je metilacija DNA ključna za razvoj kralješnjaka. Gubitak metilacije rezultira apoptozom u embrija i fibroblasta, ali ne u embrijskih matičnih stanica niti stanica raka te dovodi do smanjenja ekspresije gena i transkripcijske aktivacije transpozona (15).

2.2. HISTONSKA MODIFIKACIJA

U eukariota DNA i histoni stvaraju kompleks koji se naziva kromatin. Strukturalne jedinice kromatina su nukleosomi koji se sastoje od 147 parova baza (pb) DNA zavijute oko oktamera histonskih proteina. Taj oktamer se sastoji od po dva od svakog histonskog proteina (H2A, H2B, H3, H4) (9), a dva su nukleosoma povezana histonskim proteinom H1 koji doprinosi stabilnosti strukture. Kromatin je potom kondenziran namotovanjem u spiralnu strukturu višeg reda koja se organizira u petlje DNA (1). Razlike u stupnju kondenzacije određuju strukturu kromatina i na osnovi toga može se diferencirati u dva funkcionalna stanja: eukromatin i heterokromatin, to jest transkripcijski aktivnu i inaktivnu formu kromatina (7). Za transkripcijski aktivni kromatin karakteristične su modifikacije histona koje predstavljaju još jedan dobro proučeni epigenetski mehanizam također uključen u fetalno programiranje (16). Te su modifikacije posttranslacijske (eng. posttranslational modification, PTMs) i reverzibilne te su obično smještene na N-kraju histonskih proteina (7). One utječu na kromatinski okoliš acetilacijom, metilacijom, fosforilacijom, ubikvitinizacijom i ADP-ribozilacijom (16). Kada se te modifikacije iskombiniraju na različite načine, one tvore „histonski kod“ koji regulira dinamiku kromatina utječući na vezivanje drugih regulatornih proteina na DNA i samim time djeluju na transkripciju DNA. Bitnu ulogu ostvaruju i u popravku DNA, njenoj replikaciji i kompakciji kromatina (7).

Modifikacije histona upravljane su i mogu se održavati raznim enzimima čije razine ekspresije variraju ovisno o vanjskim faktorima okoliša (npr. nedostatak nutrijenata) tijekom kritičnih razvojnih razdoblja (16). Histonske acetilaze (HAT) i deacetilaze (HDAC) uključene su u acetilaciju, a metiltransferaze (HMT) kataliziraju dodavanje tri metilne skupine na lizin ili arginin na histonu (dominantno na H3 i H4). Upravo su acetilacija i metilacija lizina na histonskim krajevima najčešće histonske modifikacije i

utječu na transkripcijsku aktivnost, acetilacija povećavajući ekspresiju, a metilacija ili povećavajući ili smanjujući ekspresiju gena ovisno o tome na koji kraj histona djeluje; na primjer H3K4me3 i H3K36me3 su aktivni markeri, a H3K27me3 i H3K9me3 su povezani s genskom represijom (7).

Histonske modifikacije mogu ponekad biti posljedica okolišnih čimbenika te mogu igrati važnu ulogu u razvoju normalnih, ali isto tako i patoloških procesa (7). Karcinogeneza je jedan od tih patoloških procesa za koji je otkriveno da su pojedine histonske modifikacije poput gubitka metilacije Lys16 i trimetilacije Lys20 na histonu H4 povezane s nastankom neoplastičnih procesa (17). Daljnja saznanja na području tumorigeneze, ali i ostalih bolesti i patoloških stanja vezanih uz modifikacije histona, to jest uz enzime zaslužne za tu modifikaciju, mogli bi predstavljati metu za nove terapijske metode (18,19).

2.3. NEKODIRAJUĆE RNA

Iako nisu toliko dobro proučene poput DNA metilacije i histonske modifikacije, nekodirajuće regulatorne RNA (ncRNA) imaju bitnu ulogu u normalnom razvoju i funkciji stanica, ali i bolesti. NcRNA mogu se podijeliti na kratke (eng. small non-coding RNAs, sncRNA), intermedijarne (eng. intermediate sized non-coding RNAs, is-ncRNA) te heterogenu grupu dugih RNA (eng. long non-coding RNAs, lncRNA) (7). Svoje djelovanje mogu ostvariti na mnoge načine, a jedan od njih je inhibicija translacije RNA pomoću interferencije – kratke dvolančane RNA vežu se na homolognu glasničku RNA (eng. messenger RNA, mRNA) nakon djelovanja ribonukleaze te induciraju njezinu degradaciju (1).

2.3.1. Mikro RNA

Najproučavanije među nekodirajućim RNA su mikroRNA (miRNA), molekule koje su evolucijski ostale očuvane, a smještene su većinom (70%) u intronima i egzonima gena te manjim dijelom (30%) u intergenskim regijama (9). MiRNA su kratke, nekodirajuće RNA molekule dužine 20-25 nukleotida (16) i tvore strukture nalik ukosnicama (20). Svoju funkciju eliminacije genske ekspresije (7) ostvaruju direktnom translacijskom represijom, destabilizacijom mRNA ili kombinacijom toga dvoje (21–23). Pošto se može vezati za komplementarnu mRNA djelomično homologne sekvence, logično je da pojedina miRNA može imati mnoga ciljna mjesta u genomu te iz toga isto slijedi da pojedini transkript mRNA može biti cilj mnogih miRNA (24).

2.3.2. LncRNA

Duge nekodirajuće molekule RNA (lncRNA) još su jedna vrsta nekodirajuće RNA koja ima regulacijsko djelovanje (7). LncRNA duža je 8-10 puta od miRNA te broji više od 200 nukleotida u duljini (25). Eksperimentalna detekcija humanog genoma identificirala je otprilike pedeset tisuća različitih lncRNA, dok je miRNA identificirano oko 25 puta manje, dakle otprilike dvije tisuće (25).

Ovisno o poziciji lncRNA u genomu, razlikujemo transkripcijske jedinice koje „stoje same“ (eng. stand-alone), one koje su prepisane iz pojačivača (eng. enhancer, eRNA), promotora (TSSa-RNA, ua-RNA, pas-RNA, PROMPT) ili introna pojedinih gena te one iz pseudogena (26).

LncRNA, poput miRNA, regulator je bioloških procesa na razini posttranskripcije i represije gena koji kodiraju proteine (25). Specifičnije, lncRNA ima bitnu ulogu u regulaciji alelne ekspresije, posebno u inaktivaciji X kromosoma i genomskom imprintingu (26). Ono što razlikuje lncRNA od miRNA je činjenica da se duge nekodirajuće RNA molekule mogu ponašati poput „molekularne spužve“ koja reducira regulatorni utjecaj mikro RNA na glasničku RNA (25).

2.3.3. Kružna RNA

Kružna RNA (eng. circular RNA, circRNA) pripada obitelji nekodirajućih RNA molekula (27) i to dugih nekodirajućih RNA (28), a ističe se po svome nelinearnom obliku koji nastaje kovalentnim vezanjem 3' i 5' krajeva (29). CircRNA većinom se formiraju alternativnim prekrajanjem pre-mRNA (29) u kojemu se uzvodni akceptor prikraja nizvodnom donoru u procesu nelinearnog „backsplicinga“ (28). CircRNA ima različite potencijalne funkcije, a neke od njih su sudjelovanje u transkripcijskom i posttranskripcijskom reguliranju gena, uloga „spužve“ za miRNA te genska regulacija mehanizmom kompeticije s linearnim prekrajanjem mRNA (29).

2.3.4. Spermalna RNA

Na kraju spermatogeneze većina se citoplazme i RNA molekula izbaci iz spermija te u spermiju preostaju samo pojedini fragmenti mRNA i male nekodirajuće RNA (sncRNA) koje bi mogle predstavljati osnovu prijenosa epigenetičkih informacija na embrio tokom fertilizacije (30).

Glavne klase sncRNA pronađene u spermija bile su mikro RNA (miRNA), endogene male interferirajuće RNA (eng. endogenous small interfering RNA, endo-siRNA) te piwi interaktivne RNA (eng. piwi-interacting RNA, piRNA). MiRNA i endo-siRNA kratke su nekodirajuće RNA koje imaju ulogu u RNA induciranom utišavajućem kompleksu (eng. RNA-induced silencing complex, RISC) koji ima ulogu u utišavanju gena (30). PiRNA također su kratke nekodirajuće RNA duge 26-31 nukleotida te interagiraju s MIWI, MIWI2 i MILI, proteinima iz PIWI obitelji i imaju ulogu u utišavanju i DNA metilaciji transpozona (30).

Novija istraživanja otkrila su da je većina sncRNA u spermijima zapravo mala spermalna RNA iz transportne RNA (eng. sperm transfer RNA derived small RNAs, tsRNAs) (30). TsRNA većinom su fragmenti 5' kraja tRNA i variraju u dužini od 29 do 34 nukleotida (30). Iako su detalji njihova djelovanja još uvijek nepoznati, postoji mogućnost da imaju ulogu u transgeneracijskom nasljeđivanju o čemu će biti govora kasnije.

3. EPIGENETIČKI DOGAĐAJI U TRUDNOĆI

3.1. VAŽNOST EPIGENETIKE U NASTANKU I RAZVOJU ZAMETKA

Epigenetika je iznimno važna za nastanak i razvoj zametka jer ona omogućava da jedan genotip vodi ka različitim fenotipovima ovisno o „epigenetskom stanju“ jednog ili više genskih lokusa (31). U humanoj genetici najbolje znani epigenetički događaji jesu inaktivacija X kromosoma i parentalni imprinting.

3.2. INAKTIVACIJA X KROMOSOMA

Razvojem tehnologije za proučavanje kromosoma uočilo se da je u ženki miševa jedan X kromosom drugačije kondenziran od svih drugih kromosoma (31). Zato je dr. Mary Lyon 1961. predložila teoriju da je taj kromosom inaktiviran, a kao dokaz su služili njezini nalazi mozaičnog uzorka mišjeg krzna u onih miševa za koje se znalo da su heterozigoti za X-vezane gene koji kodiraju za boju mišjeg krzna u kombinaciji s tadašnjim saznanjima da je ženka miša koja ima samo jedan X kromosom vijabilna (32). Njezina je hipoteza potvrđena te je inaktivacija X kromosoma (eng. X-chromosome inactivation, XCI) njoj u čast nazvana lionizacija (31).

Lionizacija se događa oko 15. dana trudnoće kada se embrio sastoji od otprilike 5000 stanica. Bilo koji od X kromosoma može biti inaktiviran. Epigenetički proces diferencijalne metilacije kodiran je *XIST* (eng. X inactivation specific transcript) genom koji se eksprimira samo s inaktivnog X kromosoma i producira RNA koja širi inaktivacijski signal metilacije uzduž istog X kromosoma, ostavljajući gene u pseudoautosomalnoj regiji na vrhu kratkog kraka aktivnima uz još neke lokuse na dugom i kratkom kraku. To se događa zato što bi, kad bi se inaktivirao cijeli X kromosom, svaka žena imala kliničku sliku Turnerova sindroma, a svaki muškarac i žena s jednim X kromosomom viška imali bi normalan fenotip (31).

3.3. GENOMSKI UTISAK

Genomski utisak ili genomski imprinting (eng. genomic imprinting) epigenetički je fenomen koji uzrokuje ekspresiju gena ovisnu o tome od kojeg je roditelja gen naslijeđen (31). Glavni mehanizam kojim je ekspresija regulirana je metilacija DNA (33). Dakle, gen od jednog roditelja „utiša“ se metilacijom ili na majčinu ili očevu nasljednom materijalu pa ekspresija alela utisnutog gena ovisi o tome je li naslijeđen od majke ili oca. Alelna ekspresija (maternalna ili paternalna) može varirati među stanicama, specifičnim tkivima ili fazama razvoja (34). Za sada je poznato više od 80 utisnutih gena u ljudi i regije u kojima se nalaze nazivaju se diferencijalno metilirane regije (eng. differentially methylated regions, DMRs) i one uključuju kontrolne regije za genomski utisak (eng. imprinting control regions, ICRs) koje kontroliraju ekspresiju utisnutih gena (31).

Razvojem tehnologije nuklearnog transfera došlo je do velikog pomaka u proučavanju genetskog imprintinga u sisavaca jer se tom metodom istraživala mogućnost generiranja diploidnog uniparentalnog embrija (35). McGrath i Solter transplantirali su pronukleuse embrija iz jednostanične faze kako bi konstruirali diploidne mišje embrije s dva ženska pronukleusa (ginogenetski embrij) ili dva muška pronukleusa (androgenetski embrij) i usporedili sposobnost ta dva embrija da se razviju u terminu u usporedbi s embrijima koji su imali transplantiran izoparentalni pronukleus (36). Rezultati su pokazali kako ginogenetski i androgenetski embriji ne mogu dovršiti normalnu embriogenezu, dok ju je kontrolni embrio uspio dovršiti. Iz toga su zaključili da maternalni i paternalni doprinos embrionalnom genomu u sisavaca nije jednak: štoviše, ginogenetski je embrij u vrijeme smrti imao defektna ekstraembrionalna tkiva, dok je androgenetski embrij imao defekte u embrionalnom tkivu. Ti su nalazi doveli do razvoja hipoteze da embrionalni razvoj zahtijeva utisnute gene eksprimirane iz majčina genoma, a paternalni genom eksplicira utisnute gene potrebne za razvoj ekstraembrionalnih tkiva (35).

Utisnuti geni predstavljaju susceptibilne mete za nastanak brojnih patoloških stanja zbog toga što se nalaze u funkcionalnom haploidnom stanju što znači da je dovoljna jedna mutacija, genska ili epimutacija, koja će dovesti do disregulacije njihove funkcije i shodno tome do potencijalno štetnih posljedica po zdravlje (34). Kada se anomalije u genetskom imprintingu dogode tijekom ranog razvoja, najčešće se manifestiraju kao razvojni i neurološki poremećaji poput Angelmanova i Prader-Willijeva sindroma, a kada se dogode kasnije u životu, manifestiraju se većinom kao tumori.

Angelmanov sindrom (AS) prezentira se kao neurološki poremećaj; oboljeli imaju usporen razvoj, eplepsiju, ataksičan hod i govorne teškoće (31). Genska osnova AS najčešće je delecija regije 15q11-q13 na majčinom kromosomu. Fenotip AS nastaje zbog gubitka gena *UBE3A* (jedan od ubikvitinskih gena) koji se preferencijalno eksplicira s maternalnog kromosoma 15 u mozgu (31) dok je paternalni gen utišan imprintingom i ne može nadoknaditi gubitak majčinog.

Ista regija kromosoma 15 deletirana je u Prader-Willijevu sindromu (PWS), samo što se tu radi o deleciji na očevu kromosomu koji je potreban za ekspresiju *SNRPN* gena (ne eksplicira se s majčinog, utišanog alela) (31). Sindrom se prezentira niskim rastom, pretižću, hipogonadizmom, teškoćama u učenju i hipotonusom.

Kao što je već rečeno, anomalije u genskom imprintingu kasnije u životu često dovode do razvoja tumora. To se događa zbog hipometilacije, tj. gubitka utiska (eng. loss of imprinting, LOI) koji može dovesti do aktivacije alela koji je obično utišan i pojačane ekspresije produkta koji pridonose rastu stanica (31). LOI može dovesti do aktivacije onkogeni i shodno tome do povećanog rizika od nastanka tumora te je proučavan na *IGF2/H19* lokusu na kromosomu 11p15.5. Hipometilacija (LOI) na majčinu alelu rezultira povećanom ekspresijom *IGF2* što je dokazano najčešći zajednički događaj u mnogih tumorima (pluća, jetra, kolon, jajnici) kao i u Wilmsova tumoru u kojeg je prvi put identificiran (31).

3.4. TRUDNOĆA

U trudnoći, točnije tijekom razvoja embrija, zbivaju se valovi demetilacije u kojima se brišu prijašnji metilacijski obrasci DNA i oni predstavljaju početak reprogramiranja spolnih stanica, kao i genoma spermija i oocite nakon oplodnje, a kasnije se formiraju novi metilacijski obrasci pomoću *de novo* metilacije (4). Ubrzo nakon oplodnje, to jest u perikonceptcijskom periodu, dolazi do diferencijalne metilacije oocite i spermija u diferencijalno metiliranim regijama (DMR) gameta što ultimativno rezultira ekspresijom jednog alela. Moguće je da je baš u tim periodima razvoja najvjerojatnije da će neki endogeni ili egzogeni utjecaji inducirati trajne promjene u metilaciji (9) (*de novo* metilacija) te samim time promijeniti obrazac utiskivanja (eng. imprinting) te kasnije i ekspresiju pojedinih gena (37).

3.4.1. Demetilacija u zigoti i PGC

DNA demetilacija je proces gubitka metilacije koji može biti pasivan, ali i aktivan. Aktivna demetilacija zbiva se posredovanjem enzima poput TET enzima koji konvertiraju 5-metilcitozin (5mC) u 5-hidroksimetilcitozin (4), dok pasivna demetilacija označava gubitak metilne skupine iz 5mC uzrokovan inhibicijom ili nedostatkom DNMT1 tijekom DNA replikacije (38).

Demetilacija se događa tijekom dva razvojna perioda – prvi je preimplantacijski period, a drugi je u primordijalnim matičnim stanicama (eng. primordial germ cells, PGC). Pošto se taj proces događa striktno u tim fazama, one predstavljaju prozore povećane osjetljivosti (9).

Prije oplodnje gamete su u različitim fazama staničnog ciklusa i genomi su im različito organizirani. Oocita je zaustavljena u metafazi II i ima diploidni genom pun histona, a zreli spermij završio je mejozu i ima haploidni genom ispunjen protaminima (38) koji omogućuju kompakciju DNA potrebnu za formaciju zrelog spermija (4). Kada spermij uđe u zonu pellucidu, događaju se trenutačne promjene u obje gamete: oocita završi drugu mejozu i izbací polarno tjelešće, a protamini u spermiju prepuštaju mjesto histonima (38). Zanimljivo je da nije sva DNA u spermiju vezana protaminima. U malom dijelu lokusa koji sadržavaju histone (5-10%) nalazi se zapis za RNA transkripte koji imaju potencijalne uloge u različitim procesima poput genomskog prepoznavanja, konsolidacije-konfrontacije (teorija konsolidacije i konfrontacije govori o tome da je spermij strano tijelo oociti i oocita ga treba „prepoznati“ i „prihvatiti“ kako bi došlo do oplodnje (39)), ranog embrionalnog razvoja te epigenetskog transgeneracijskog nasljeđivanja (40). Unutar par sati (4-8) od oplodnje očevo se pronukleus demetilira u potpunosti (15) i taj proces završava prije prve stanične diobe (38). Naprotiv, majčin se genom pasivno (15) i postupno demetilira tijekom početnih staničnih dioba (9). Ne zna se točan uzrok nejednakoj dinamici demetilacije majčina i očeva pronukleusa, no neka od mogućih objašnjenja su asimetrična depozicija histona H3.3 u DNA spermija, asimetrični obrasci histonskih modifikacija u majčinu i očevu pronukleusu te neki nehistski faktori poput stella proteina (eng. developmental pluripotency-associated protein 3, DPPA3; PGC7) pri čijem nedostatku dolazi do demetilacije oba pronukleusa (38).

No važno je reći da, kako je dokazao Solter, u procesu globalne demetilacije genoma u zigoti, stečeni utisci (imprinti) ostaju intaktni i ta razlika u imprintu gena s majčinog i očevog genoma prisutna u stanicama embrija omogućuje rast i diferencijaciju (36).

Primordijalne stanice sazrijevaju i započinju migraciju prema spolnom naboru u trećem tjednu embrionalnog razvoja (4), ali prije dolaska dolazi do gubitka DNA metilacijskih obrazaca. To se događa u prisutnosti DNMT1 i stoga se smatra kako je taj proces demetilacije DNA aktivan (38).

Aktivna DNA demetilacija također se zbiva u somatskim stanicama, ali samo na specifičnim genskim lokusima kao odgovor na određene signale. Primjeri toga su aktivna demetilacija T-limfocita u regiji pojačivača promotora interleukina-2 i to u roku 20 minuta od stimulacije T-limfocita. Hormoni također mogu uzrokovati lokus-specifičnu demetilaciju. Naime, pod utjecajem paratiroidnog hormona dolazi do aktivne demetilacije promotora citokroma p450, podobitelji 27B, polipeptida 1 (*CYP27B1*) (38).

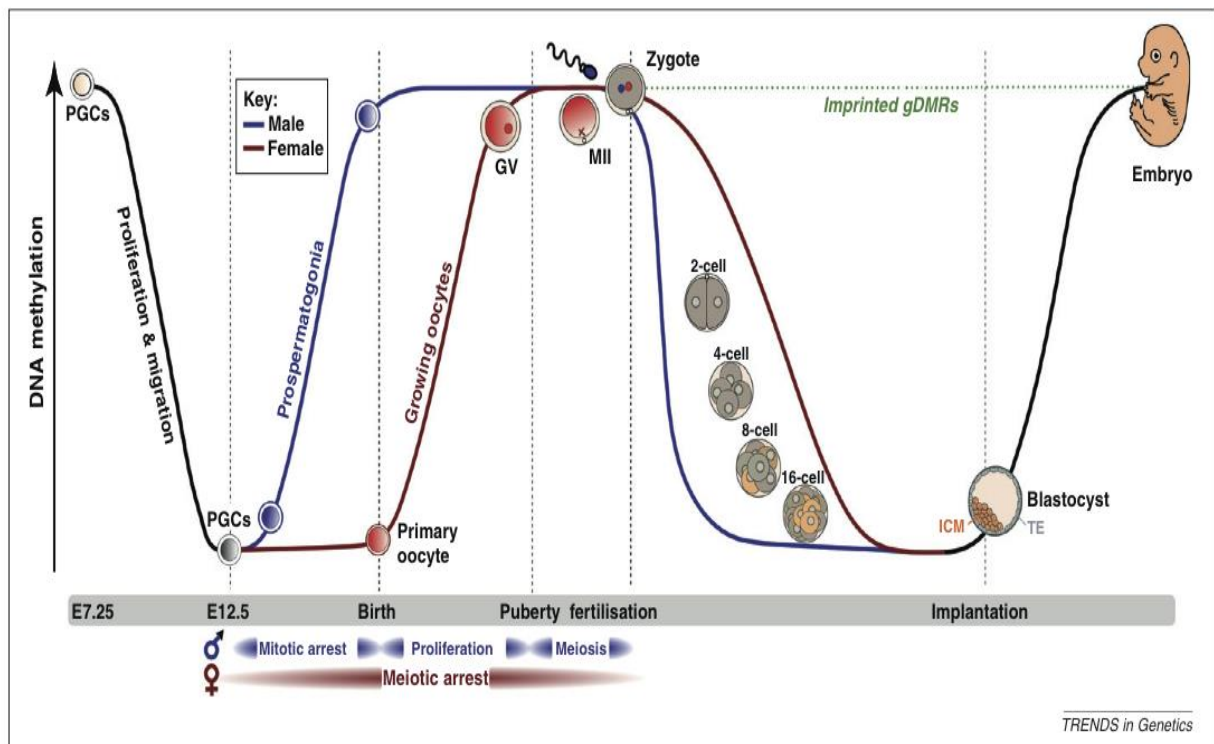
3.4.2. Remetilacija

Remetilacija je proces koji slijedi nakon demetilacije DNA i pri kojem se stvaraju novi metilacijski obrasci. Oko i nakon perioda implantacije počinje globalna *de novo* metilacija (9). Ona je prvi put otkrivena kada je retroviralna DNA transfektirana u preimplantacijski mišji embrio u nemetiliranom stanju koje je kasnije prešlo u stabilno metilirano stanje u stanicama miševa, ali samo kada se infekcija dogodila u ranijoj fazi gastrulacije (33). To je upućivalo na to da se *de novo* metilacija događa u pluripotentnim stanicama ranih embrija. Daljnja testiranja bila su na stanicama embrionalnog karcinoma i embrionalnim matičnim stanicama (eng. embryonic stem cells, ES cells). U tim stanicama inficiranim retrovirusima u potpunosti je metilirana virusna RNA čak i kada je deletiran *Dnmt1* gen što govori u prilog postojanju drugih DNA metiltransferaza. Daljnjim istraživanjima ustanovljeno je kako u *de novo* metilaciji bitnu regulatornu ulogu imaju DNA metiltransferaze 3A i 3B (DNMT3A i DNMT3B) te kofaktor DNMT3L (eng. DNA methyltransferase 3 like) (33).

DNMT3 obitelj sudjeluje u oblikovanju novih metilacijskih obrazaca u embrionalnim somatskim stanicama u stadiju epiblasta (4) koji u miševa nastupa oko 6. dana embrionalnog razvoja (E6,5), a u ljudskog zametka krajem drugog tjedna embrionalnog razvoja (13.-14. dan). Nakon te remetilacijske faze embrij počinje ubrzano rasti i diferencirati se te počinje organogeneza (4).

Nakon determinacije spola embrija, oblikuju se novi metilacijski obrasci spolnih stanica, različiti za muški i ženski embrij. U muških fetusa *de novo* metilacija počinje prije mejoze u mitotički zakočenim stanicama (G1 faza, prospermatogonije) te završava prije rođenja (41). U ženskih fetusa primarne oocite započinju mejozu te bivaju zakočene u profazi I (diploten) i ostaju u dormantnom stanju, većinom nemetilirane te njihova *de novo* metilacija uslijedi tijekom postnatalne faze rasta oocita (41). Najveće razlike u metilaciji muških i ženskih spolnih stanica nađene su u CpG otocima (eng. CpG island, CGI) (41). Analizom genoma otkriveno je 900 specifično metiliranih CGI u zrelih oocita i 60 specifično

metiliranih u spermiju; u tim su CGI također nađene neke od spolno diferencijalno metiliranih regija utisnutih gena (eng. germline differentially methylated regions of imprinted genes, gDMRs) (41).



Slika 2. Promjene u metilaciji DNA tijekom razvojnog epigenetskog reprogramiranja. Metilacijski obrasci primordijalnih spolnih stanica (eng. primordial germ cells, PGCs) globalno se brišu tokom njihova putovanja prema spolnom naboru (crna linija). Kako dolazi do determinacije spola, tako se stvaraju novi metilacijski obrasci (plava linija-muški embrij, crvena linija-ženski). Nakon oplodnje dolazi do demetilacije parentalnih genoma - prvo očevog (plava linija), a majčinog kasnije, nešto sporije (crvena linija). Ta postfertilizacijska demetilacija ne obuhvaća utisnute gene (imprinte) u diferencijalno metiliranim regijama (gDMR) (zelena točkasta linija). Prema: Smallwood i Kelsey, Figure 1 (41).

4. FAKTORI KOJI MIJENJAJU EPIGENOM

Kao što je već rečeno, fetalno je razdoblje vremenski okvir u kojemu se ustanovljuju ključni obrasci DNA metilacije i genske ekspresije te stoga predstavlja kritičnu točku u razvoju pošto se smatra kako epigenetičke modifikacije mogu perzistirati kasnije u odrasloj dobi i utjecati na susceptibilnost za razvoj bolesti. Epigenetičke modifikacije, posebno CpG metilacija, reagiraju na ekstrinzične čimbenike dopuštajući im da ostave „okolišne otiske“ na DNA (5). U tekstu koji slijedi bit će pobliže prikazani neki od njih.

4.1. NAVIKE

4.1.1. Pušenje

Izloženost majke duhanskom dimu (eng. maternal tobacco smoke exposure, MTSE) tokom trudnoće povezano je sa značajnim morbiditetom i mortalitetom novorođenčadi i može utjecati na kasniji razvoj mnogih bolesti (42) poput astme, karcinoma, pretilosti i dijabetesa tipa 2 (7).

Pušenje utječe i na razvoj posteljice negativnim utjecajem na ekstravilozne stanice trofoblasta koje služe za migraciju i invaziju trofoblasta u stijenku maternice što dovodi do povećanog rizika za nastanak placente previje i placentalne abrupcije (43). Poremećen razvoj posteljice utječe na rast fetusa zbog narušene opskrbe fetusa hranjivim tvarima i kisikom, izmjene plinova i otpadnih tvari te proizvodnje hormona potrebnih za normalan razvoj fetusa (43).

Napravljeno je više metaanaliza povezanosti pušenja majke i pretilosti u djetinjstvu (44). Jedna je istraživala povezanost doza-učinak između broja cigareta koje majka konzumira tokom trudnoće i pretilosti potomka (44,45). Rezultati su pokazali kako postoji pozitivna korelacija između rizika za pretilost potomaka i broja dnevno konzumiranih cigareta u trudnoći. Ta povezanost najizraženija je u djece od 5 do 8 godina što je u skladu s prijašnjim dokazima da djeca predškolske dobi, čije su majke pušile tokom trudnoće, imaju viši BMI nego djeca onih majki koje nisu pušile (46).

Projekt Viva kohorta povezala je prenatalnu izloženost pušenju sa smanjenom koncentracijom IGF-1 u krvi pupkovine u odnosu na koncentraciju IGF-1 u krvi pupkovine novorođenčadi čije majke nisu pušile za vrijeme trudnoće (47). Smanjena koncentracija IGF-1 povezana je s manjom porođajnom masom i dužinom pri rođenju u općoj populaciji (47) te bi mogla predstavljati predispoziciju kasnijim metaboličkim i kardiovaskularnim bolestima u potomka. U ljudi, mutacije u IGF-1 vode ka smanjenju sekrecije inzulina i visokom riziku obolijevanja od dijabetesa tipa 2, a *in vitro* modeli ukazuju da sniženje IGF-1 utječe na poremećenu formaciju pankreatičnih β -stanica (47).

U Avon longitudinalnoj studiji roditelja i djece (eng. Avon Longitudinal Study of Parents and Children, ALSPAC) istraživana je povezanost prenatalne izloženosti majčinu pušenju i metilacija DNA potomaka u oko 800 parova majka-dijete (48). Petnaest CpG metilacijskih obrazaca na sedam genskih regija

povezano je s maternalnim pušenjem i to ovisno o dozi i trajanju pušenja. Prema uzorcima uzetim 7 i 17 godina nakon, neka CpG mjesta pokazala su reverzibilnost metilacije (*GFII*, *KLF13* i *ATP9A*), a drugi su metilacijski obrasci perzistirali (*AHRR*, *MYO1G*, *CYP1A1* i *CNTNAP2*). Usporedba maternalnog i paternalnog pušenja i metilacije u potomka pokazala je kako je jača povezanost metilacije i maternalnog pušenja (48).

Jedno od prvih istraživanja (49) povezanosti metilacije krvi iz pupkovine s maternalnim pušenjem identificiralo je diferencijalnu metilaciju u *AHRR*, *CYP1A1* i *GFII* (49). *AHRR* i *CYP1A1* imaju ključnu ulogu u detoksifikaciji duhanskog dima. Mnogi od identificiranih gena povezani su s razvojem rascjepa usne i nepca, karcinoma i astme, ali još uvijek se ne zna jesu li utvrđene metilacijske promjene uzročno-posljedično povezane s razvojem tih bolesti ili su samo pouzdan biomarker za iste (49).

4.1.2. Alkohol

Poznato je kako opsežno konzumiranje alkohola tokom trudnoće može uzrokovati širok fetalni alkoholni spektar poremećaja (eng. Fetal Alcohol Spectrum Disorders, FASD), od strukturnih do neurorazvojnih, s fetalnim alkoholnim sindromom (FAS) kao najozbiljnijim (50). Težina FASD-a ovisi ponajviše o vremenu izloženosti, dozi i frekvenciji izloženosti alkoholu, a opsežna izloženost u drugoj polovici prvog trimestra povezuje se s najgorim ishodima (50).

Danas još nije u potpunosti poznato koji su učinci slabe do umjerene konzumacije alkohola tokom trudnoće, ali epigenetske modifikacije predložene su kao potencijalni mehanizam kao što je slučaj kod pušenja (48,51).

Jedno istraživanje na štakorima pokazalo je da je perinatalna izloženost alkoholu uzrokovala smanjenje ekspresije gena za metil-CpG-vezujući protein 2 (eng. methyl CpG binding protein 2, MeCP2) te DNA metiltransferaze 1 i 3a (DNMT1 i DNMT3a) u usporedbi s onima koji nisu bili izloženi alkoholu (52). Također je pronađena povećana aktivnost DNA metiltransferaza u hipokampusu i prefrontalnom korteksu štakora izloženih etanolu nakon što već neko vrijeme nisu bili izloženi (vrijeme ekvivalentno svim trima trimestrima u ljudi). To ukazuje na dugotrajne promjene u regulaciji epigenoma u mozgu što bi moglo objasniti dugotrajne bihevioralne deficite viđene nakon izloženosti alkoholu i u životinjskih modela FASD-a i u ljudi (52).

Sharp i suradnici (50) napravili su metaanalizu šest kohorti kako bi istražili metilacijske obrasce DNA uzoraka krvi iz pupkovine novorođenčadi koja je bila izložena alkoholu *in utero*. Također su usporedili rezultate s onima iz istraživanja diferencijalne metilacije DNA bukalnih stanica u djece s FASD u usporedbi s kontrolama (53) i diferencijalne DNA metilacije pune krvi u odraslih iz opće populacije koji piju blago do umjereno u usporedbi s onima koji ne konzumiraju alkohol (54). Rezultati metaanalize nisu pokazali jake dokaze koji bi potvrdili povezanost prenatalne izloženosti alkoholu i metilacije DNA krvi iz pupkovine (50). Tri su interpretacije njihovih pronalazaka: prva je da blaga do umjerena

izloženost alkoholu nema učinka na metilaciju DNA, druga je da nisu uspjeli detektirati učinak na metilaciju u krvi iz pupkovine i da su za to potrebna specifična tkiva te treća koja govori o metodološkim ograničenjima zbog kojih nije uspješno pronađena diferencijalna metilacija DNA (50).

Revijalna studija Mandala i suradnika (10) objedinila je mnoštvo istraživanja (*in vitro* i *in vivo*) u kojima su istraživane histonske modifikacije nastale djelovanjem alkohola tijekom fetalnog razvoja. Poznato je da alkohol utječe na brojne signalne puteve, stanice i molekularne mehanizme, ali još nije poznato o kojim se točno epigenetičkim mehanizmima radi. U tablici 3.1. prikazan je dio pronalazaka objavljenih u Mandalovoj studiji, ali još uvijek se ne zna koja je točna povezanost između specifičnih modifikacija histona i FASD fenotipova (10).

Tablica 3.1. Sažetak istraživanja histonskih modifikacija nastalih djelovanjem alkohola *in utero*. Prema Mandal i sur., Table 1. (10)

| Način izloženosti alkoholu | Uzorak | Modifikacija histona |
|--|---|---|
| ŠTAKOR | | |
| 4 h/dan inhalacije etanolskih para | mozak (cerebelum, P8) | Redukcija H3 i H4 acetilacije. Reduciran nivo H3K23ac. |
| etanol kao tekućina | Mozak (P60-P80 od F1, F2 i F3 generacije) | Redukcija H3K4me2, H3K4me3 i H3K9ac oznaka, indukcija H3K9me2 oznaka. |
| 200 mM <i>in vitro</i> (na staničnoj liniji deriviranoj od fetalnog srca) | H9c2 stanična linija | Indukcija H3 acetilacije. |
| MIŠ | | |
| 25% etanol (3,75 g/kg) | pluća (E13.5) | Indukcija H3K9/18ac. |
| 1,0 ili 2,5 g/kg (supkutane injekcije) | mozak (P7) | Elevacija G9a mRNA aktivnosti, indukcija H3K9me2 i H3K27me2. |
| 2,5 g/kg (supkutane injekcije) | mozak (P7) | Elevacija H4K8ac i redukcija H3K9me2 na egzonu 1 <i>CB1R</i> gena |
| 6 g/kg/dan (56%) intragastrično | fetalno srce (E14.5) | Elevacija H3K14ac oznaka i ekspresije <i>DHAND</i> i <i>EHAND</i> gena. |
| 2,5 g/kg (supkutane injekcije) | mozak (P7) | Redukcija H3K9me2 oznaka. |
| E-embriionalni dan, P-postnatalni dan, ac-acetilacija, me2-dimetilacija, me3-trimetilacija | | |

4.1.3. Stres

Istraživanja pokazuju kako su potomci traumatiziranih roditelja pod povećanim rizikom od razvoja mentalnih i fizičkih bolesti (55). Dokaz tome su potomci ljudi koji su preživjeli holokaust. Podatci istraživanja utjecaja holokausta na potomke generacije njemu izložene (56) pokazali su da su potomci, iako nisu doživjeli više traumatskih iskustava, imali veću prevalenciju obolijevanja od posttraumatskog stresnog poremećaja nego demografski slični ispitanici s kojima su uspoređivani.

Projekt ledena oluja (Project Ice Storm) (57) je istraživanje koje je provedeno na potomcima majki izloženih ledenoj oluji u Quebecu 1998. Trinaest godina nakon proučavali su profil metilacije DNA T-limfocita potomaka i uspoređivali ga s rezultatima koje su dobili od uzoraka slin iste djece, ali pet godina ranije te su pronašli prvi dokaz da prenatalni stres majki (eng. prenatal maternal stress, PNMS) rezultira trajnom, široko obuhvatnom i funkcionalno organiziranom metilacijom DNA u većem broju tkiva potomaka.

Što se tiče epigenetskih promjena, pronađena je veza između ranog izlaganja stresu i aberantne metilacije DNA gena poput gena za glukokortikoidni receptor i serotonin 1A receptor (7). Stres također utječe na promjene u histonima poput povećanja razine H3K4me3 i smanjenja razine H3K9me3 u dentatnom girusu (7).

4.1.4. Fizička aktivnost

Istraživanja fizičke aktivnosti i bolesti potomaka pokazala su varijabilne rezultate. Naime, neki rezultati pokazuju pozitivan i protektivan učinak vježbanja (uz održanje i povećanje vitalnosti), a drugi pak negativan. Istraživanja na mišjem modelu pokazala su kako fizička aktivnost očeva može poboljšati fenotip potomaka (4). Dijeta i vježbanje tokom 8 tjedana u miševa hranjenih velikim količinama masnoća (eng. high fat diet, HFD) normalizirali su veliku količinu X-vezanih miRNA u sjemenoj tekućini i prevenirali metaboličke poremećaje u ženskih potomaka (58). Druga je pak studija pokazala da dugotrajna tjelovježba u mužjaka miša predisponira intoleranciju na glukozu i rezistenciju na inzulin u njihovih muških potomaka (59). Moguć mehanizam nastanka je oksidativni stres zbog izraženije tjelovježbe te sukladno tome nastanak epimutacija i promjena na miRNA u sjemenoj tekućini (4).

4.1.5. Prehrana

Vitamin B9, poznat kao folna kiselina, potreban je za sintezu tetrahidrofolata i moramo ga unositi prehranom pošto se ne može *de novo* sintetizirati u tijelu. On služi kao kofaktor u sintezi 5-metiltetrahidrofolata (donor metilne skupine za remetilaciju homocisteina u S-adenozilmetionin) i kao donor metilne skupine za DNA i histone što je potrebno za održavanje razina metilacije (7). Donori metilne skupine mogu utjecati na epigenom na globalni način i na lokus-specifični način, a manjak folne kiseline doprinosi nastanku tumora u animalnih modela (7). Primjer tomu je utjecaj maternalne prehrane

na mišji *Agouti* gen – gen odgovoran za određivanje hoće li mišje krzno biti prugasto (*Agouti*) ili jednobožno (*non-Agouti*) i reguliran metilacijom DNA retrotranspozona smještenog u promotorskoj regiji *Agouti* gena (60). Kad je retrotranspon metiliran, mišje je krzno jednobožno, ali kad je nemetiliran, ono je isprugano ili žuto i miš će imati povećan rizik od razvoja dijabetesa i tumora (7). Dostupnost metilnih donora prije i tijekom trudnoće dovela je do povećane metilacije u *Agouti* genu budućih potomaka (7).

Štetna izlaganja majke tokom trudnoće-uključujući prekomjernu i preslabu prehranu, pretilost, rezistenciju na inzulin ili dijabetes-promoviraju alteracije u metabolizmu i zdravlju potomka (4). Majka koja boluje od dijabetesa (gestacijskog ili od prije poznatog) može imati povećane koncentracije glukoze u krvi koje prolaze fetoplacentalnu barijeru i dovode do povećana lučenja inzulina u fetusa što je povezano s povećanim rastom potomka, povećanim rizikom od pretilosti i disregulacije hipotalamusa (4). Djeca majki koje su išle na barijatrijsku operaciju i tako reducirale svoju težinu imaju smanjen rizik od razvoja metaboličkih bolesti kasnije u životu u usporedbi s njihovom braćom i sestrama rođenim prije majčinog gubitka na težini (4). Te su fenotipske razlike među potomcima povezane s diferencijalnom metilacijom gena koji reguliraju inzulinsku rezistenciju (4).

Događaji poput ratova te ekonomskih i političkih kriza, koji su za ljude predstavljali velike katastrofe, omogućili su proučavanje utjecaja manjkave prehrane na ljudske populacije jer su poslužili kao dobra osnova za retrospektivne kohortne studije (4). Primjer takve retrospektivne studije jest studija u kojoj su sudjelovali ispitanici koji su prenatalno bili izloženi nizozemskoj gladnoj zimi od 1944. do 1945. tokom Drugog svjetskog rata. Ti su ispitanici šest desetljeća nakon izloženosti gladovanju imali manju metilaciju *IGF2* gena nego njihovi neizloženi braća i sestre (61).

4.1.6. Lijekovi

Mnogi lijekovi mogu imati teratogeni učinak i taj se učinak često otkrije mnogo prije nego njegova molekularna osnova te teratogenosti.

Valproat se koristi kao terapija za epilepsiju, bipolarni poremećaj, tešku depresiju, migrenu te shizofreniju (7). Izloženost valproatu *in utero* povezana je s povećanom incidencijom defekata neuralne cijevi. Rezultati istraživanja Tung i Winn (62) na miševima izloženim valproatu tokom trudnoće pokazalo je povećanje metilacije H3K4 i smanjenje metilacije H3K9 što bi moglo predstavljati molekularnu osnovu teratogenosti valproata.

Kod pacijenata liječenih temozolomidom, kemoterapeutikom koji se koristi kao terapija glioma, pronađeni su aberantni DNA metilacijski uzorci u sjemenoj tekućini (7).

4.2. OKOLIŠNI ČIMBENICI

4.2.1. Endokrini disruptori

Endokrini disruptori (eng. endocrine-disrupting chemicals, EDC) egzogene su kemikalije koje mijenjaju normalnu funkciju hormona (63). U predgovoru dokumenta kojeg je izdala Svjetska zdravstvena organizacija (SZO, eng. WHO - World Health Organization) u sklopu Internacionalnog programa za kemijsku sigurnost (eng. International Programme on Chemical Safety, IPCS), endokrini disruptori definirani su kao: „...kemikalije koje imaju potencijal za interferenciju s endokrinim sustavom.“; dok je u prvom poglavlju navedena ova definicija: „...egzogeno supstanca ili mješavina koja mijenja funkcije endokrinog sustava i dovodi do štetnih posljedica po zdravlje u intaktnom organizmu, njegovu potomstvu ili (sub) populaciji. Potencijalni endokrini disruptor je ona egzogeno supstanca ili mješavina koja posjeduje osobine koje od kojih bi se moglo očekivati da dovode do endokrine disrupcije u netaknuta organizma, njegova potomstva ili (sub) populacije.“ (64).

Učinke endokrinih disruptora na žive organizme i ljudsko zdravlje prvi je puta zabilježila biologinja Rachel Carson 1962. godine (64) u svojoj knjizi *Tiho proljeće*: „Te prskalice i zaprašivači se danas primjenjuju gotovo na svakoj farmi, vrtu, šumi i kući – neprovjerene kemikalije koje mogu ubiti svakog kukca, bez obzira bio on koristan ili ne; one su utišale pjev ptica i skakutanje riba u brzacima, prekrivši lišće sa smrtnim slojem i pomješavši se sa zemljom – samo zbog malo kukaca i korova. Ne mogu vjerovati da je moguće prekriti površinu Zemlje sa tolikom količinom otrova bez da se razmišlja da li je to dobro za cjelokupan život. Ne bi se trebali zvati insekticidi ili ubojice kukaca, već biocidi ili ubojice života.“ (65).

Izloženost endokrinim disruptorima rano u životu zabrinjavajuća je zbog njihove sveprisutnosti u okolišu (5) i rezultati epidemioloških studija ukazuju da izloženost *in utero* utječe na prevalenciju bolesti, posebno metaboličkih, kasnije u životu (63).

4.2.1.1. *Obesogeni*

Pretilost, koja je u posljednje vrijeme poprimila pandemijske razmjere, doprinosi povećanoj incidenciji raznih bolesti te je većinom vezujemo uz povećani kalorijski unos (63). Unatrag petnaestak godina u literaturi se spominju obesogeni, podskupina endokrinih disruptora koja se vezuje uz epidemiju pretilosti (37) zbog sposobnosti tih spojeva da promoviraju pretilost alteriranjem adipogeneze, povećavanjem skladištenja energije u obliku masnog tkiva te interferencijom s neuroendokrinom kontrolom gladi i sitosti (66). Baille-Hamilton napisala je 2002. godine članak u kojemu je prvi put povezan utjecaj kemijskih tvari s epidemijom pretilosti (67), a Grün i Blumberg 2006. su godine prvi definirali obesogene iznijevši svoju hipotezu o obesogenima (68). Hipoteza o obesogenima istaknula je dvije bitne stavke. Prva je da se susceptibilnost za debljinu formira tijekom *in utero* razvoja i u prvih par godina života, a druga je da ta susceptibilnost nastaje djelovanjem podgrupe EDC-a, obesogena (69).

4.2.1.2. Bisfenol-A

Bisfenol-A (BPA) je monomer koji se koristi u proizvodnji polikarbonatne plastike i može se naći u brojnim ambalažama hrane i pića te u medicinskim pomagalicama. BPA ima značajne estrogenske učinke (5) koje ostvaruje vezivanjem na estrogenske receptore ER α i ER β te se prenosi transplacentarno i tijekom laktacije s majke na fetus, tj. na dojenče (37).

In utero izloženost štakora „sigurnim“ dozama BPA (50 μ g/kg/dan) povezano je s povećanom razinom metilacije DNA što rezultira poremećenom regulacijom inzulina i kontrolom glukoze (70). Poslije direktne F0 izloženosti štakora BPA-u tijekom gestacije i laktacije, potomci F1 generacije nisu pokazali značajne promjene u toleranciji na glukozu/inzulin u 3. tjednu poslije rođenja, ali u 21. tjednu pronađene su povećane koncentracije inzulina u krvi te rezistencija na inzulin. Također je pronađena značajna hipermetilacija promotorske regije *Gck* gena u jetri F1 generacije u tjednu 3 i 21 u usporedbi s kontrolnom skupinom koja nije bila izložena BPA-u (71). *Gck* gen je ključan za regulaciju iskorištavanja glukoze u hepatocitima pošto on kodira za enzim glukokinazu, a njegovom hipermetilacijom dolazi do smanjene proizvodnje tog enzima nužnog za fosforilaciju glukoze. Mutacije u *Gck* genu povezane su dijabetesom tipa 2 te dijabetesom mladih (eng. maturity-onset diabetes of the young, MODY) (37) i stoga ga smatramo genom za susceptibilnost za dijabetes.

Utjecaj BPA na pretilost u ljudi proučavala se kroz sedam prospektivnih kohortnih studija (72). Tri su studije ukazale da je visoka prenatalna izloženost BPA-u povezana sa smanjenim indeksom tjelesne mase (eng. body mass index, BMI) i to izraženije u djevojčica, druge dvije povezale su prenatalnu izloženost s povećanim opsegom struka, BMI-jem i rizikom za pretilost dok preostale dvije kohorte nisu našle poveznica između prenatalne izloženosti bisfenolu-A i mjerila dječje pretilosti. Iako te kohorte nisu pokazale jednoznačnu povezanost BPA i pretilosti u ljudi, presječna istraživanja (73,74) ukazuju da je izloženost BPA-u u pozitivnoj korelaciji s pretilošću, ali iz presječnih istraživanja ne možemo donositi zaključke o uzročno-posljedičnim povezanostima pa je potrebno provesti još kohortnih studija kako bismo uspjeli doći do jednoznačnih zaključaka.

4.2.1.3. Diklor-difenil-trikloretan

Diklor-difenil-trikloretan (DDT) jedan je od najpoznatijih insekticida koji se počeo koristiti 40-ih godina prošlog stoljeća te je UN zabranio njegovu upotrebu 2001. Štokholmskom konvencijom o perzistentnim organskim onečišćivačima, osim u slučajevima epidemija uz posebno odobrenje WHO-a (75). Zbog razvoja globalne trgovine, još uvijek se u slobodnoj prodaji mogu pronaći namirnice kontaminirane DDT-om (37).

U istraživanju utjecaja DDT-a na F1 i F3 generaciju, Skinner i suradnici (76) izlagali su trudne štakore (F0) nižim (25 mg/kg/dan) i višim dozama (50 mg/kg/dan) DDT-a. U F2 generacije nije bilo razvoja pretilosti, no došlo je do razvoja bolesti testisa, bubrega i jajnika te razvoja karcinoma u odrasloj dobi. U

F3 generaciji 50% mužjaka i ženki razvilo je pretilost u skupini s nižom izloženosti te 75% mužjaka u skupini s višom razinom izloženosti. Također, pronađene su diferencijalno metilirane regije (DMR) u *Tubb3*, *Slc4a4* i *Carm1* genima u spermiji F3 generacije. U F1 generacije razvoj pretilosti nastupio je zbog direktne izloženosti fetalnih somatskih stanica DDT-u.

Diklor-difenil-dikloretilen (DDE) je razgradni produkt DDT-a koji se formira u okolišu ili tijelu i često se mjeri uz DDT pošto se također povezuje uz štetne učinke na zdravlje (5). Iako i DDT i DDE imaju duge poluživote, DDE je predominantno nađen u trudnih žena koje su sudjelovale u studiji koja je ispitala nacionalno zdravlje i prehranu (National Health and Nutrition Examination Survey) (5).

Prenatalna izloženost DDT-u i DDE-u povezana je s nizom ranih i kasnih učinaka na zdravlje, uključujući utjecaj na fetalne mjere rasta, neurorazvoj adolescenata, reproduktivnu funkciju žena te funkciju pluća (5). Kada se ispitala povezanost DDT-a, DDE-a i globalne metilacije fetalnog epigenoma, rezultati studije CHAMACOS (Center for Health Assessment of Mothers and Children of Salinas) ukazali su da je razina tih tvari u majčinom serumu recipročno povezana s Alu metilacijom u krvi iz pupkovine, iako dodatna istraživanja u toj kohorti nisu pronašla vezu između placentarnih razina DDE i globalne metilacije (5). Ta inkonzistencija unutar iste kohorte mogla bi ukazivati da DDT ima tkivno-specifične učinke na fetalni epigenom.

4.2.1.4. Ftalati

Ftalati su kemijski spojevi koji se koriste u plastičnoj (37) i kozmetičkoj (5) industriji. Ftalati se mogu inhalirati, ingestirati te apsorbirati kroz kožu. Kao indikator izloženosti ftalatima najčešće se koristi mjerenje metabolita izlučenih u urinu (5). Velik broj ftalata koristi se u industriji, ali pojedini se češće detektiraju pa se stoga koriste u epidemiološkim istraživanjima - oni uključuju di(2-etilheksil) ftalat (DEHP), dietil ftalat i dibutil ftalat (5). DEHP je ftalat koji se koristi kao plastifikator u proizvodima za svakodnevno korištenje. Pronađen je u humanoj amnionskoj tekućini, krvi iz pupkovine, mlijeku, sjemenjnoj tekućini i slini (37).

Izlaganje DEHP-u povezano je s disbalansom energije i metaboličkim poremećajima (37). Razna ispitivanja u štakora pokazala su da DEHP smanjuje utilizaciju glukoze iz krvi i hepatalnu glukoneogenezu u ispitivanih štakora (77). DEHP-u izloženi štakori također imaju reducirani transport glukoze i laktata u mišićima, smanjenje mišićne heksokinaze te hepatalne glukokinaze i sinteze glikogena (78), kao i poremećenu homeostazu glukoze na razini gušterače, ali i cijelog tijela (79).

CHAMACOS studija koristila je parove majka-novorodjenče te su mjerene razine metabolita ftalata niske molekularne mase (eng. low molecular weight, LWM) u urinu te je pronađena negativna korelacija monoetil ftalata s Alu metilacijom u krvi pupkovine (80). Globalna hipometilacija nastala zbog izloženosti ftalatima također je potvrđena u jednoj kineskoj kohorti trudnih žena (81) u kojoj su razine DEHP u urinu bile povezane s hipometilacijom LINE1 u placenti. Genski specifična hipometilacija

pronađena je u studiji u kojoj su mjerene razine ftalata u urinu majke u prvom trimestru i CpG metilacija *H19* i *IGF2* (82). Ti rezultati ukazuju na moguću disregulaciju tih gena nužnih za razvoj.

4.2.1.5. *Smjese*

Izloženost smjesama EDC-a češća je nego izloženost pojedinačnim EDC-ima, no istraživanja većinom proučavaju utjecaj pojedinačnih kemijskih tvari na organizam i zbog toga nemamo potpune spoznaje o individualnim, interaktivnim i kumulativnim učincima smjesa endokrinih disruptora (69). Zbog velikog broja okolišnih čimbenika kojima smo izloženi svakodnevno, postoji potreba za identifikacijom onih koji su povezani sa štetnim učincima na zdravlje, posebno zato što može doći do sinergističkog djelovanja pri izloženosti smjesama endokrinih disruptora (69).

Manikkam i suradnici (83) proučavali su smjesu BPA, DEHP i dibutil ftalata (DBP, plastifikator koji se koristi u lateks adhezivima, kozmetici, celuloznoj plastici i kao otopalo za boje (37)). Te su tri tvari pronađene u ljudskom organizmu i sve su derivirane iz različitih plastičnih proizvoda (37). U spomenutom istraživanju trudne ženke štakora bile su izložene smjesi BPA, DEHP i DBP-u slične koncentracije poput onih u istraživanjima izloženosti pojedinim EDC-ima. Rezultati su pokazali povećanu incidenciju pretilosti u F3 generaciji u mužjaka i ženki, ali ne i u F1 generaciji potomaka (83).

4.2.2. **Metali**

Poznato je da izloženost mnogim metalima poput arsena, olova i žive ima negativan utjecaj na ljudsko zdravlje. Recentne studije ukazuju da bi promjene u epigenetskim mehanizmima mogle igrati ključnu ulogu u molekularnim mehanizmima uključenim u nastanak bolesti povezanih s izloženošću metalu (7).

4.2.2.1. *Arsen*

Arsen (As) se normalno pojavljuje u okolišu kao element zemljine kore. Kada se poveže s drugim elementima poput kisika, klora ili sumpora, arsen postaje anorganska smjesa (iAs) koja u povećanim koncentracijama (određena radna mjesta, nesanirana odlagališta otpada, područja s prirodno visokim koncentracijama iAs) može dovesti do razvoja brojnih kroničnih stanja poput dijabetesa tipa 2, kardiovaskularnih bolesti, neuroloških bolesti te brojnih karcinoma (84). Izloženost arsenu tijekom prenatalnog razdoblja povezana je s promjenama u obrascima metilacije DNA krvi iz pupkovine te s genski specifičnim promjenama DNA metilacije u placenti i leukocitima majke i fetusa (7).

4.2.2.2. *Olovo*

Olovo (Pb) je teški metal koji se može naći u brojnim proizvodima poput baterija, keramike, igračaka i cijevi (84). Čak i pri vrlo malim koncentracijama, prenatalna izloženost olovu rezultira neurorazvojnim poteškoćama i reduciranom inteligencijom djeteta te dovodi do spolno ovisnih promjena u metilaciji DNA krvi iz pupkovine (7).

4.2.2.3. Živa

Živa (Hg) je reaktivni metal koji se može naći u baterijama, fluorescentnim žaruljama, termometrima i termostatima, no ljudi većinom bivaju izloženi konzumiranjem ribe i školjaka kontaminiranih živom (7). *In vivo* istraživanja na štakorima pokazala su da prenatalna izloženost živi dovodi do smanjenja proliferacije neuralnih stanica što je povezano s hipometilacijom DNA (7). *In utero* izloženost u ljudi također je dovela do promjene u metilaciji DNA te se pretpostavlja kako te promjene mogu utjecati na proporciju imunskih stanica u krvi pupkovine (7).

4.2.3. Ionizirajuće zračenje

Ionizirajuće zračenje inducira nestabilnost genoma spolnih stanica i moglo bi imati štetne učinke na potomke (85). Jedan neriješeni epidemiološki događaj nazvan Sellafield slučaj povezo je paternalnu izloženost zračenju i povećan rizik za nastanak leukemije i ostalih malignih bolesti u potomaka (85). Naime, godine 1980. primjećeno je da velik broj djece koja žive u blizini nuklearne elektrane Sellafield obolijeva od malignih bolesti. Daljnjim istraživanjem otkriveno je da je u djece koja su rođena u Seascaleu (selo blizu nuklearne elektrane) povećan rizik razvoja maligniteta, ali ne i u djece koja su se doselila u Seascale nakon rođenja. Također je dokazano da su djeca čiji su očevi radili u elektrani u vrijeme začeca imala tri puta veći rizik od razvoja leukemije i non-Hodgkinova limfoma prije dobi od 25 godina. Ta su otkrića dovela do razvoja „Gardnerove hipoteze“ koja predlaže uzročno posljedičnu povezanost između paternalne izloženosti ionizirajućem zračenju i povećanog rizika nastanka malignih bolesti u potomka (85). Gardnerova je hipoteza odbačena poslije usporedbe s ostalim studijama poput one provedene na preživjelima nakon pada atomske bombe u Japanu (u potomaka izloženih očeva nije pronađen povećani rizik od razvoja maligniteta) (85). Još uvijek nisu pronađena točna epigenetička objašnjenja za događaje u Seascaleu.

5. TRANSGENERACIJSKI OBRAZAC EPIGENETSKOG NASLJEĐIVANJA

Studije u humanih i animalnih modela pokazale su kako izlaganja okolišnim čimbenicima koja su iskusili roditelji tijekom svoga intrauterinog i postnatalnog života mogu utjecati ne samo na njihovo zdravlje, već i na zdravlje njihovih potomaka te mogu pokrenuti ciklus povećanog rizika za bolest kroz generacije čak i bez daljnje prisutnosti tih okolišnih stresora. Dakle, zdravlje roditelja i direktno izlaganje okolišnim stresorima koje su doživjele spolne stanice mogu doprinijeti razvojnom programiranju potomka i povećanju njihova rizika za bolest (4).

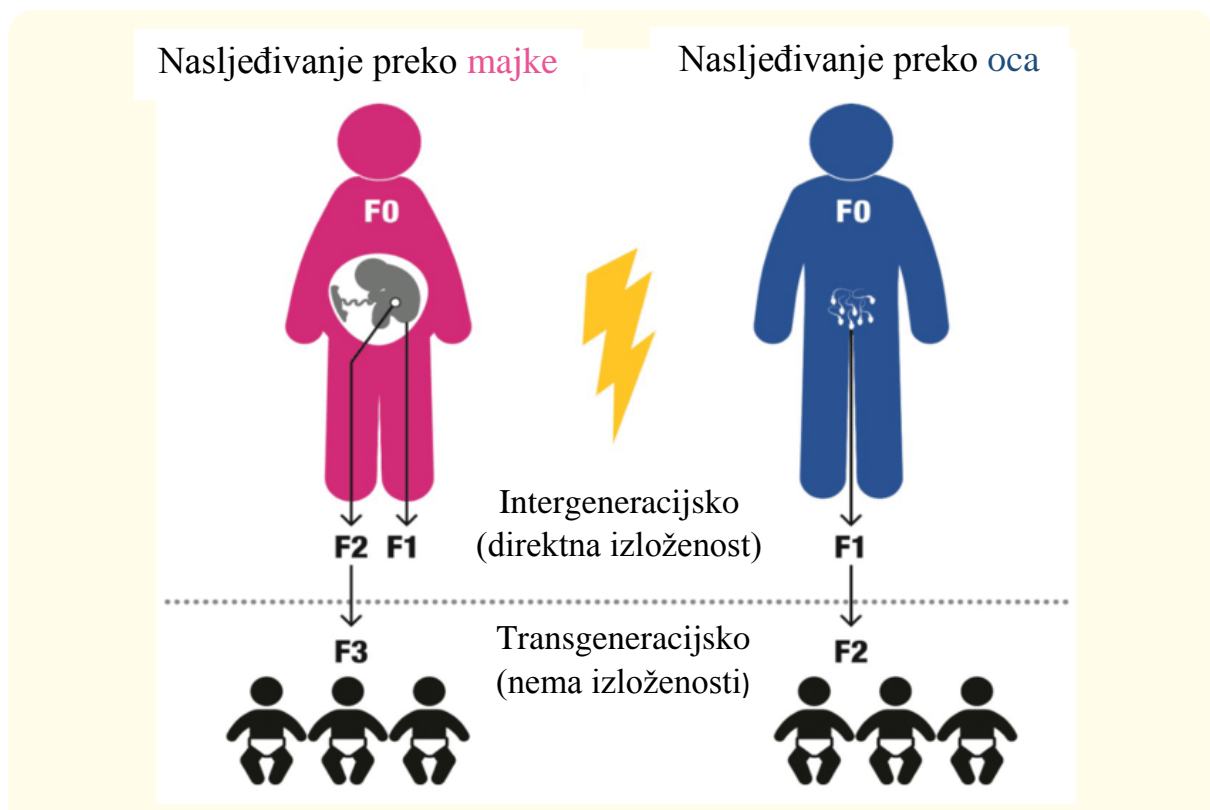
Obrazac nasljeđivanja može biti intergeneracijski (tj. multigeneracijski (37)) te transgeneracijski. Parentalno (F0) izlaganje tijekom trudnoće može utjecati na zdravlje potomka F1 i potomka F2 generacije – ti intergeneracijski efekti mogli bi biti posljedica direktnog djelovanja stresora na somatske stanice fetusa F1 generacije utječući na proliferaciju, diferencijaciju i razvoj pojedinih organa (4). Pošto se germinativne stanice fetusa F1 generacije razvijaju tijekom gestacije, unuci (F2) isto su direktno izloženi. Kada bi se posljedice vidjele na F3 generaciji, koja nije bila direktno izložena tim čimbenicima, obrazac nasljeđivanja bio bi transgeneracijski. Ukoliko je prvotno izlaganje bilo preko oca (F0), transgeneracijske posljedice bile bi one u F2 generaciji pošto je samo F1 potomak bio direktno izložen (37) (Slika 3).

Epigenetsko pamćenje osnova je za razvoj vijabilnog potomka, ali isto tako igra bitnu ulogu i u razvoju bolesti. Transgeneracijsko epigenetsko nasljeđivanje može rezultirati bolešću zbog epimutacija koje se prenose na potomke (86).

Zna se da je učestalost genetskih i epigenetskih mutacija povećana u starijih individua. Jedan primjer epigenetičkog, međugeneracijskog učinka je utjecaj očinske dobi na sposobnost potomstva, često nazvana Lansingovim učinkom (87). Lansingov učinak povezuje smanjenje životnog „*fitnessa*“ potomaka s povećanom očinskom dobi (87). Transgeneracijske posljedice Lansingovog učinka mogu utjecati na stopu genetskih i fenotipskih promjena populacije, što pak utječe na sposobnost populacije da se prilagodi i održi (87). Ipak, unatoč društvenoj važnosti za naše razumijevanje evolucije starenja i dugovječnosti, mehanističke osnove Lansingova učinka još uvijek nisu poznate. On je identificiran u raznolikom rasponu vrsta, uključujući ptice, te je prikazan u divljih vrabaca (*Passer domesticus*). Doista, u prirodnoj populaciji, utvrđeno je da su stari vrapčići imali potomstvo s nižom životnom sposobnošću (87). Utjecaj ovog efekta mogao bi se odraziti i u humanoj populaciji, u kojoj u današnje doba dolazi do pomicanja dobne granice za stvaranje potomstva.

Mehanizmi nasljeđivanja epigenetskih obrazaca još nisu u potpunosti otkriveni, ali ono što se zna je da je tokom demetilacije DNA dio parentalnih epigenetskih promjena poput utisnutih gena zaštićen od reprogramiranja tijekom razvojnih stadija. Okolišno inducirane alteracije procesom DNA metilacije

nazvane diferencijalno metilirane regije (DMR) prisutne u spolnim stanicama ponašaju se poput utisnutih gena u smislu da njihovi metilacijski obrasci perzistiraju (88). Diferencijalno metilirana mjesta povezana s transgeneracijskim nasljeđivanjem nazivaju se nalik-utisnutim (eng. imprinted-like) (89). Prijenos epigenetskih informacija na buduće generacije putem spolnih stanica može promijeniti epigenom embrijskih matičnih stanica što bi posljedično dovelo do promjene epigenetskog i transkriptomskog programiranja svih deriviranih somatskih stanica. One stanice koje su osjetljive na te promjene u epigenomu i transkriptomu mogle bi pokazati povećanu susceptibilnost za razvoj bolesti (88).



Slika 3. Shematski prikaz intergeneracijskog i transgeneracijskog nasljeđivanja uslijed izlaganja okolišnim čimbenicima; Prema: Feroe, Broene, Albuquerque i Ruiz, Figure 2. (37)

5.1. DOKAZI

5.1.1. Metaboličke bolesti

Događaji poput ratova te ekonomskih i političkih kriza, koji su za ljude predstavljali velike katastrofe, omogućili su proučavanje utjecaja manjkave prehrane na ljudske populacije. Retrospektivne kohortne studije pružaju dokaze koji podržavaju teoriju intergeneracijskih efekata (u ovom slučaju manjkave prehrane tokom prenatalnog i ranog postnatalnog razvoja). Studije o nizozemskoj gladnoj zimi, periodu nestašice hrane i gladi za vrijeme njemačke blokade Nizozemske krajem Drugog svjetskog rata (1944.-

1945.) pružile su brojne informacije o utjecaju gladi na sljedeće generacije. Naime, nedovoljna prehrana majki za vrijeme trudnoće povezana je s povećanom količinom masnog tkiva, hipertenzijom, intolerancijom na glukozu te psihijatrijskim poremećajima u njihove djece tokom odrasla života. Slični su pronalasci viđeni za različite populacije diljem svijeta (4). Velika kineska oskudica (1959.-1961.) bila je najveća oskudica u povijesti čovječanstva i rezultirala je s otprilike 30 milijuna ljudskih smrti i otprilike jednako mnogo pobačaja. Pojedinci rođeni odmah nakon tog perioda imali su veći rizik obolijevanja od hipertenzije u odrasloj dobi (90), žene su imale veći BMI i masu kasnije u životu (91) te su bile veće stope dijabetesa tipa 2 ili hiperglikemije (4). Ukrajinska glad (1932.-1933.) također je pokazala povezanost rane gestacijske restrikcije nutrijenata s razvojem dijabetesa tipa 2 u odrasloj dobi. Glad tijekom Nigerijskog građanskog rata (1967.-1970.) rezultirala je pothranjenošću tijekom gestacije i djetinjstva i također je povezana s oštećenom tolerancijom na glukozu u odraslom životu (4).

Niska porođajna masa, neovisno o prehrambenim faktorima, povećava rizik od metaboličkih bolesti kasnije u životu. David Barker prvi je otkrio povezanost porođajne mase i kasnijeg razvoja kardiovaskularnih i ostalih metaboličkih bolesti u odraslom životu (92). Kasnije studije diljem svijeta, uključujući i Helsinšku kohortnu studiju (93) te Kinesku studiju o rodnoj masi (94) potvrdile su tu povezanost.

Nekolicina studija istraživala je ulogu malih nekodirajućih RNA u transgeneracijskom nasljeđivanju te je otkriveno da sncRNA derivirane iz spermija (uključujući miRNA i tsRNA) imaju potencijal za utjecanje na embrionalni razvoj i vode ka transgeneracijskom nasljeđivanju (30). Jedan od primjera je utjecaj prehrambenog stresa (poput prehrane bogate mastima, HFD) na kasniji razvoj metaboličkih poremećaja u potomaka (30). U 2016. godini dva su odvojena istraživanja (30) pokazala da je prehrana bogata mastima ili prehrana siromašna proteinima u mužjaka miševa povezana s povećanim razinama tsRNA u spermija što je kasnije povezano s metaboličkom bolešću u njihovih potomaka. U tim su istraživanjima također unijeli dijetom inducirane tsRNA u oocite oplodene spermijima mužjaka koji su se normalno hranili što je dovelo do razvoja metaboličkih poremećaja u potomaka F1 generacije te poremećene ekspresije gena metaboličkih puteva. Time je dokazano da su dijetom inducirane tsRNA odgovorne za fenotip potomaka.

5.1.2. Stres

Većina istraživanja intergeneracijskog nasljeđivanja stresa je posvećena proučavanju disfunkcije osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (eng. hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) u potomaka roditelja izloženih stresu. Novija istraživanja posvetila su se proučavanju epigenetskih modifikacija i neuroanatomskih promjena u potomaka. Otkrivene su mnoge biološke poveznice, ali još se ne zna točan mehanizam transfera stresa. Kortizol je jedan od potencijalnih faktora odgovornih za to nasljeđivanje,

pošto dokazi sugeriraju da cirkulirajući kortizol dopire do gameta i fetusa. Također kortizol, kao dio glukokortikoidnog receptorskog kompleksa, utječe na transkripciju gena i mogao bi krajnje dovesti do alteracije fetalnog epigenoma (55). Recentni pronalasci ukazuju da bi miRNA, za koju postoji mogućnost da je regulirana kortizolom i dokazano je da je regulirana stresom, mogla imati ulogu u nasljeđivanju (55,95,96). Neka su istraživanja pokazala da je injiciranje spermalne miRNA traumatiziranih mužjaka u oplodene oocite povezano s bihevioralnim i metaboličkim poremećajima u potomaka, sličnim onima koji nastaju kod rane separacije od majke (30).

5.1.3. Endokrini disruptori

Značajni primjeri transgeneracijskog nasljeđivanja osobina koje se ne prenose genima jest izloženost endokrinim disruptorima (4). Kao što je navedeno prije u tekstu, endokrini disruptori grupa su spojeva koji oponašaju, blokiraju ili interferiraju s proizvodnjom, metabolizmom i djelovanjem hormona u tijelu (97). Mehanizam za koji se trenutno smatra da uzrokuje transgeneracijsko nasljeđivanje promijenjene metilacije DNA jest taj da EDC-i sprječavaju demetilaciju određenih regija DNA tijekom embrionalnog razvoja (66). Razni enzimi odgovorni su za globalnu demetilaciju, a EDC-i bi mogli represivno djelovati na ekspresiju gena koji ih kodiraju (66). Tretiranje trudnih miševa vinklozinom (antiandrogenom koji se koristi kao fungicid) povećalo je rizik od neplodnosti, tumorsku formaciju, bolest bubrega, imunosne abnormalnosti te anksiozna ponašanja kroz četiri generacije (98,99).

Endokrini disruptori su spojevi sveprisutni u okolišu te u hrani i vodi koju konzumiramo i sve više se povezuju s epidemijom pretilosti (37). Kao što je već navedeno prije, obesogeni su definirani kao spojevi (prirodni, farmaceutski, ksenobiotski) koji promoviraju pretilost povećanjem broja masnih stanica ili pohranjivanjem masti u već postojeće masne stanice. Također mogu djelovati indirektno na adipocite mijenjanjem brzine bazalnog metabolizma, pomicanjem energetske ravnoteže prema skladištenju kalorija te mijenjanjem hormonalne kontrole apetita i sitosti (100).

Izloženost obesogenima u mišjih je modela pokazala povećan rizik za pretilost te obolijevanje od dijabetesa tipa 2 (4). DDT je povijesno jedan od najkorištenijih insekticida. Izloženost DDT-u tijekom kritičnog perioda razvoja germinativnih stanica promovira epigenetičko transgeneracijsko nasljeđivanje pretilosti do F3 generacije štakora (37). TBT, aditiv, uzrokovao je povećano odlaganje masnog tkiva u F2 i F3 generaciji, miševi su imali veći volumen i broj adipocita i sve to unatoč kontroliranom kalorijskom unosu (37).

5.1.4. Obogaćeni okoliši

Mnoge animalne studije potvrdile su da su glodavci razvijani u okolišima ispunjenim s pregršt senzornih, motornih, socijalnih i kognitivnih stimulansa imali bolje kognitivne performanse od onih odgajanih u standardnim okolišima. Epigenetički mehanizmi imaju ulogu u dugoročnim kognitivnim efektima uzrokovanim takvim stimulansima. Naime, ukupne razine H3 i H4 acetilacije i metilacije je povećan u hipokampusu i korteksu stimuliranih miševa i taj kognitivni porast može se oponašati injekcijama inhibitora histonskih deacetilaza (98,101).

U jednoj studiji na miševima nađeno je nasljeđivanje boljeg pamćenja i povećane sinaptičke plastičnosti na potomke i to preko majke. Bitno je napomenuti kako to nije ovisilo o majčinoj skrbi pošto je obogaćenje perzistiralo i nakon „udomljavanja“ (102). Iako se još ne zna puni mehanizam toga nasljeđivanja, moguće je da se radi o mehanizmima sličnim nasljeđivanju stresom uzrokovanih epigenetskih promjena. Ukoliko je to tako, otvorila bi se nova vrata za bihevioralne intervencije koje bi mogle kompenzirati negativna životna iskustva (98).

6. ZAKLJUČAK

Uzevši u obzir da brojni okolišni čimbenici mogu dovesti do epigenetskih modifikacija, oni predstavljaju veoma bitno područje interesa za buduća znanstvena istraživanja koja će voditi k novim saznanjima o nastanku bolesti u odraslih sa začetkom još u fetalnom razdoblju. Najviše utjecaja na fetalni epigenom imaju endokrini disruptori zbog svoje široke rasprostranjenosti u okolišu i prisutnosti u proizvodima koji se nalaze u svakodnevnoj uporabi. Zbog toga predstavljaju područje interesa brojnih znanstvenika te su mnoga istraživanja već provedena, a vjerojatno će još mnoga tek biti kako bi se utvrdio cjelokupni obujam njihova utjecaja na nastanak epigenetskih modifikacija te kako bi se objasnilo samo značenje tih modifikacija i njihov utjecaj na zdravlje i bolest. Drugo veliko interesno područje za istražitelje predstavlja mogućnost transgeneracijskog nasljeđivanja. U ovom su radu ponuđeni neki od „dokaza“ koji govore u prilog prenošenju epigenetskih modifikacija kroz generacije i do onih koje ni na koji način nisu bile izložene, ni direktno ni indirektno, utjecaju okolišnih čimbenika. Unatoč tome, znamo da nakon oplodnje dolazi do brisanja otprije uspostavljenih metilacijskih obrazaca što se protivi teoriji transgeneracijskog nasljeđivanja pošto DNA metilacija predstavlja najvažniji epigenetski mehanizam. Stoga se nameće pitanje je li transgeneracijski prijenos epigenetskih modifikacija uopće moguć i ako jest koji je točno mehanizam njihova prijenosa, odnosno koji su posrednici tog prenošenja? To pitanje za sada još uvijek ostaje otvoreno i ukoliko je odgovor na njega potvrđan, otkriće posttranskripcijskih mehanizama (poput malih RNA molekula koje se prenose tijekom oplodnje, na što upućuju novija istraživanja) otvorilo bi nove prilike za kliničku primjenu tih saznanja i potencijalno napravilo revoluciju u kliničkoj praksi. Sama pomisao da bi se bolest budućih generacija mogla spriječiti djelovanjem ovdje i sada, predstavlja veoma privlačan, ali i važan koncept koji bi otvorio vrata k novim mogućnostima prevencije bolesti, ali i same promocije zdravlja u ljudi.

7. ZAHVALE

Posebne zahvale svakako zaslužuje mentorica doc.dr.sc. Ana Katušić Bojanac koja je uvrstila ovu temu u popis tema diplomskih radova te je svojom pristupačnošću, ljubaznošću i entuzijazmom uvelike pomogla u stvaranju ovoga rada i u trenucima kada mi je bilo teško pronaći potrebnu motivaciju za pisanje. Njezina ljubav prema biologiji bila je pravo osvježanje i poticaj na moj vlastiti angažman i u trenucima kada mi se činilo da sam se „izgubila u prijevodu“.

Od srca zahvaljujem svojoj sestri Ani-Marii koja je uvijek bila tu da me prizemlji kada je to bilo potrebno, majci Ankici koja je hrabro izdržala svaku moju suzu i ocu Ivanu koji me je uvijek bodrio.

Zahvaljujem se svome dečku Mislavu koji mi je pružio toliko razumijevanja za nedostatak vremena tokom svih ovih godina i bio uz mene kada mi je bio najpotrebniji te svim svojim prijateljima koji su također bili uz mene.

8. LITERATURA

1. Cooper GM, Hausman RE. Stanica. 3rd ed. Lauc G, editor. Zagreb: Medicinska naklada;
2. Waddington CH. The Epigenotype. *Int J Epidemiol* [Internet]. 2012;41(1):10–3. Available from: <https://academic.oup.com/ije/article-lookup/doi/10.1093/ije/dyr184>
3. Bulić-Jakuš F. Epigenetika u reprodukciji i razvoju. *Paediatr Croat* [Internet]. 2013;57(4):312–7. Available from: <http://www.paedcro.com/hr/1535-epigenetika-u-reprodukciji-i-razvoju>
4. Sales VM, Ferguson-Smith AC, Patti ME. Epigenetic Mechanisms of Transmission of Metabolic Disease across Generations. *Cell Metab* [Internet]. 2017;25(3):559–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2017.02.016>
5. Bommarito PA, Martin E, Fry RC. Effects of prenatal exposure to endocrine disruptors and toxic metals on the fetal epigenome. *Epigenomics*. 2017;9(3):333–50.
6. A Dictionary of Public Health [Internet]. Oxford University Press; 2007 [cited 2019 Mar 20]. Available from: <http://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780195160901.001.0001/acref-9780195160901>
7. Toraño EG, García MG, Fernández-Morera JL, Niño-García P, Fernández AF. The Impact of External Factors on the Epigenome: In Utero and over Lifetime. *Biomed Res Int* [Internet]. 2016;2016:1–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27294112>
8. Surani MA. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* [Internet]. 2001;414(6859):122–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/35102186>
9. Lee HS. Impact of maternal diet on the epigenome during in utero life and the developmental programming of diseases in childhood and adulthood. *Nutrients*. 2015;7(11):9492–507.
10. Mandal C, Halder D, Jung KH, Chai YG. In Utero Alcohol Exposure and the Alteration of Histone Marks in the Developing Fetus: An Epigenetic Phenomenon of Maternal Drinking. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2017;13(9):1100–8. Available from: <http://www.ijbs.com/v13p1100.htm>
11. Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation research - Reviews in Mutation Research*. Elsevier [Internet]. 2008;659(1–2):40–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138357420800032X?via%3Dihub>
12. Hang L, Liu N, Tang Y. Coordinated and Iterative Enzyme Catalysis in Fungal Polyketide

- Biosynthesis. ACS Catal [Internet]. 2016;6(9):5935–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28529817>
13. Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. Science [Internet]. 2001;294(5551):2536–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719692>
 14. Barau J, Teissandier A, Zamudio N, Roy S, Nalesso V, Héroult Y, et al. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. Science [Internet]. 2016;354(6314):909–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27856912>
 15. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nat Genet [Internet]. 2003;33(S3):245–54. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng1089z>
 16. Hoffman DJ, Reynolds RM, Hardy DB. Developmental origins of health and disease: Current knowledge and potential mechanisms. Nutr Rev. 2017;75(12):951–70.
 17. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. Nat Genet [Internet]. 2005;37(4):391–400. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng1531>
 18. Pierce RJ, Dubois-Abdesselem F, Lancelot J, Andrade L, Oliveira G. Targeting schistosome histone modifying enzymes for drug development. Curr Pharm Des [Internet]. 2012;18(24):3567–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22607147>
 19. Dekker FJ, Haisma HJ. Histone acetyl transferases as emerging drug targets. Drug Discov Today [Internet]. 2009;14(19–20):942–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644609002189?via%3Dihub>
 20. Bartel DP. MicroRNAs. Cell [Internet]. 2004;116(2):281–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867404000455>
 21. Lee RC, Feinbaum RL, Ambrost V. The C. elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to lin-14. Cell [Internet]. 1993;75:843-54. Available from: [https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(93\)90529-Y.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F009286749390529Y%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(93)90529-Y.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F009286749390529Y%3Fshowall%3Dtrue)
 22. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. Nature

- [Internet]. 2005;433(7027):769–73. Available from:
<http://www.nature.com/articles/nature03315>
23. Wightman B, Ha L, Ruvkun G. Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene *lin-14* by *lin-4* Mediates Temporal Pattern Formation in *C. elegans*. *Cell* [Internet]. 1993;75:855-62. Available from: [https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(93\)90530-4.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867493905304%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(93)90530-4.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867493905304%3Fshowall%3Dtrue)
 24. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* [Internet]. 2005;3(3):404–18. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15723116>
 25. Dhanoa JK, Sethi RS, Verma R, Arora JS, Mukhopadhyay CS. Long non-coding RNA: its evolutionary relics and biological implications in mammals: a review. *J Anim Sci Technol* [Internet]. 2018;60(1):25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30386629>
 26. Kung JTY, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: Past, present, and future. *Genetics* [Internet]. 2013;193(3):651–69. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23463798>
 27. Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, Ivanov A, Bartok O, Hanan M, et al. CircRNA Biogenesis competes with Pre-mRNA splicing. *Mol Cell* [Internet]. 2014;56(1):55–66. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276514006741>
 28. Hansen TB, Venø MT, Damgaard CK, Kjems J. Comparison of circular RNA prediction tools. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2015;44(6):e58. Available from:
<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkv1458>
 29. Barrett SP, Salzman J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions. *Development* [Internet]. 2016;143(11):1838–47. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27246710>
 30. Champroux A, Cocquet J, Henry-Berger J, Drevet JR, Kocer A. A Decade of Exploring the Mammalian Sperm Epigenome: Paternal Epigenetic and Transgenerational Inheritance. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2018;6:50. Available from:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2018.00050/full>
 31. Turnpenny PD, Ellard S. Emery’s elements of medical genetics. 14th ed. Dimock K, McCormick H, Lowson K, editors. London: Churchill Livingstone Elsevier;
 32. Rastan S, Mary F. Lyon (1925-2014) Grande dame of mouse genetics. *Nature* [Internet]. 2015;518:36. Available from: <https://www.nature.com/articles/518036a.pdf?origin=ppub>

33. Li E, Zhang Y. DNA Methylation in Mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2014;6(5):a019133–a019133. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a019133>
34. Geneimprint : What is Genomic Imprinting? [Internet]. [cited 2019 May 22]. Available from: <http://www.geneimprint.com/site/what-is-imprinting>
35. Barlow DP, Bartolomei MS. Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2014;6(2):a018382. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24492710>
36. McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* [Internet]. 1984;37(1):179–83. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867484903131>
37. Feroe A, Broene R, Albuquerque D, Ruiz P. Endocrine Disrupting Chemicals, Transgenerational Epigenetics and Metabolic Diseases. *EC Endocrinol Metab Res*. 2017;1(2):31–51.
38. Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2010;11(9):607–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683471>
39. Miller D. Confrontation, Consolidation, and Recognition: The Oocyte’s Perspective on the Incoming Sperm. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2015;5(8):a023408. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25957313>
40. Jodar M, Selvaraju S, Sandler E, Diamond MP, Krawetz SA, Reproductive Medicine Network for the RM. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2013;19(6):604–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856356>
41. Smallwood SA, Kelsey G. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends Genet* [Internet]. 2012;28(1):33–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2011.09.004>
42. Markunas CA, Xu Z, Harlid S, Wade PA, Lie RT, Taylor JA, et al. Identification of DNA methylation changes in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Environ Health Perspect* [Internet]. 2014;122(10):1147–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24906187>
43. Maccani JZ, Maccani MA. Altered placental DNA methylation patterns associated with maternal smoking: current perspectives. *Adv Genomics Genet* [Internet]. 2015;2015(5):205. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4507353/>

44. Albers L, Sobotzki C, Kuß O, Ajslev T, Batista RF, Bettiol H, et al. Maternal smoking during pregnancy and offspring overweight: is there a dose–response relationship? An individual patient data meta-analysis. *Int J Obes [Internet]*. 2018;42(7):1249–64. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41366-018-0050-0>
45. Oken E, Levitan E, Gillman M. Maternal smoking during pregnancy and child overweight: systematic review and meta-analysis. *Int J Obes (Lond) [Internet]*. 2008;32(2):201. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2586944/>
46. Riedel C, Fenske N, Müller MJ, Plachta-Danielzik S, Keil T, Grabenhenrich L, et al. Differences in BMI z -Scores between Offspring of Smoking and Nonsmoking Mothers: A Longitudinal Study of German Children from Birth through 14 Years of Age. *Environ Health Perspect [Internet]*. 2014;122(7):761–7. Available from: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.1307139>
47. Fleisch AF, Rifas-Shiman SL, Rokoff LB, Hivert M-F, Mantzoros CS, Oken E. Associations of maternal prenatal smoking with umbilical cord blood hormones: the Project Viva cohort. *Metabolism [Internet]*. 2017;72:18–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28641780>
48. Richmond RC, Simpkin AJ, Woodward G, Gaunt TR, Lyttleton O, McArdle WL, et al. Prenatal exposure to maternal smoking and offspring DNA methylation across the lifecourse: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Hum Mol Genet [Internet]*. 2015;24(8):2201–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25552657>
49. Barouki R, Melén E, Herceg Z, Beckers J, Chen J, Karagas M, et al. Epigenetics as a mechanism linking developmental exposures to long-term toxicity. *Environ Int [Internet]*. 2018;114:77–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29499450>
50. Sharp GC, Arathimos R, Reese SE, Page CM, Felix J, Küpers LK, et al. Maternal alcohol consumption and offspring DNA methylation: findings from six general population-based birth cohorts. *Epigenomics [Internet]*. 2018;10(1):27–42. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/epi-2017-0095>
51. Joubert BR, Felix JF, Yousefi P, Bakulski KM, Just AC, Breton C, et al. DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. *Am J Hum Genet [Internet]*. 2016;98(4):680–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27040690>
52. Perkins A, Lehmann C, Lawrence RC, Kelly SJ. Alcohol exposure during development: Impact

- on the epigenome. *Int J Dev Neurosci* [Internet]. 2013;31(6):391–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23542005>
53. Portales-Casamar E, Lussier AA, Jones MJ, MacIsaac JL, Edgar RD, Mah SM, et al. DNA methylation signature of human fetal alcohol spectrum disorder. *Epigenetics Chromatin* [Internet]. 2016;9:25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27358653>
 54. Liu C, Marioni RE, Hedman ÅK, Pfeiffer L, Tsai P-C, Reynolds LM, et al. A DNA methylation biomarker of alcohol consumption. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2018;23(2):422–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27843151>
 55. Bowers ME, Yehuda R. Intergenerational Transmission of Stress in Humans. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2016;41(1):232–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2015.247>
 56. Yehuda R, Schmeidler J, Wainberg M, Binder-Brynes K, Duvdevani T. Vulnerability to Posttraumatic Stress Disorder in Adult Offspring of Holocaust Survivors. *Am J Psychiatry* [Internet]. 1998;155(9):1163–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9734537>
 57. Cao-Lei L, Massart R, Suderman MJ, Machnes Z, Elgbeili G, Laplante DP, et al. DNA Methylation Signatures Triggered by Prenatal Maternal Stress Exposure to a Natural Disaster: Project Ice Storm. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(9):e107653. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0107653>
 58. McPherson NO, Owens JA, Fullston T, Lane M. Preconception diet or exercise intervention in obese fathers normalizes sperm microRNA profile and metabolic syndrome in female offspring. *Am J Physiol Metab* [Internet]. 2015;308(9):805–21. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00013.2015>
 59. Murashov AK, Pak ES, Koury M, Ajmera A, Jeyakumar M, Parker M, et al. Paternal long-term exercise programs offspring for low energy expenditure and increased risk for obesity in mice. *FASEB J* [Internet]. 2016;30(2):775–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26506979>
 60. Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in *Avy/a* mice. *FASEB J* [Internet]. 1998;12(11):949–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9707167>
 61. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2008;105(44):17046–9. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955703>
62. Tung EWY, Winn LM. Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2010;248(3):201–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705080>
 63. Chamorro-Garcia R, Blumberg B. Current Research Approaches and Challenges in the Obesogen Field. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2019;10:167. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2019.00167/full>
 64. Damstra T, Barlow S, Bergman A, Kavlock R, Van Der Kraak G. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors [Internet]. 2002 [cited 2019 May 13]. Available from: <https://www.who.int/ipcs/publications/en/toc.pdf?ua=1>
 65. Carson RL. *Silent Spring*. 2002. New York: First Mariner Books; 1962. Str. 13.
 66. Janesick AS, Blumberg B. Obesogens: an emerging threat to public health. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2016;214(5):559–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26829510>
 67. Baillie-Hamilton PF. Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J Altern Complement Med* [Internet]. 2002;8(2):185–92. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/107555302317371479>
 68. Grün F, Blumberg B. Environmental Obesogens: Organotins and Endocrine Disruption via Nuclear Receptor Signaling. *Endocrinology* [Internet]. 2006;147(6):50–5. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2005-1129>
 69. Heindel JJ, Blumberg B, Cave M, Machtinger R, Mantovani A, Mendez MA, et al. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2017;68:3–33. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089062381630363X?via%3Dihub>
 70. Li G, Chang H, Xia W, Mao Z, Li Y, Xu S. F0 maternal BPA exposure induced glucose intolerance of F2 generation through DNA methylation change in Gck. *Toxicol Lett* [Internet]. 2014;228(3):192–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24793715>
 71. Ma Y, Xia W, Wang DQ, Wan YJ, Xu B, Chen X, et al. Hepatic DNA methylation modifications in early development of rats resulting from perinatal BPA exposure contribute to insulin resistance in adulthood. *Diabetologia* [Internet]. 2013;56(9):2059–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23748860>
 72. Braun JM. Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and neurodevelopment. *Nat*

- Rev Endocrinol [Internet]. 2017;13(3):161–73. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27857130>
73. Wang H, Zhou Y, Tang C, Wu J, Chen Y, Jiang Q. Association between bisphenol A exposure and body mass index in Chinese school children: a cross-sectional study. *Environ Health* [Internet]. 2012;11(1):79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23083070>
 74. Harley KG, Schall RA, Chevrier J, Tyler K, Aguirre H, Bradman A, et al. Prenatal and Postnatal Bisphenol A Exposure and Body Mass Index in Childhood in the CHAMACOS Cohort. *Environ Health Perspect* [Internet]. 2013;121(4):514–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23416456>
 75. DDT - Wikipedia [Internet]. [cited 2019 May 17]. Available from: <https://bs.wikipedia.org/wiki/DDT>
 76. Skinner MK, Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Haque M, Nilsson EE. Ancestral dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) exposure promotes epigenetic transgenerational inheritance of obesity. *BMC Med* [Internet]. 2013;11(1):228. Available from: <http://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7015-11-228>
 77. Mushtaq M, Srivastava SP, Seth PK. Effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on glycogen metabolism in rat liver. *Toxicology* [Internet]. 1980;16(2):153–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7414615>
 78. Martinelli MI, Mocchiutti NO, Bernal CA. Dietary di(2-ethylhexyl)phthalate-impaired glucose metabolism in experimental animals. *Hum Exp Toxicol* [Internet]. 2006;25(9):531–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17017006>
 79. Lin Y, Wei J, Li Y, Chen J, Zhou Z, Song L, et al. Developmental exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate impairs endocrine pancreas and leads to long-term adverse effects on glucose homeostasis in the rat. *Am J Physiol Metab* [Internet]. 2011;301(3):E527–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673306>
 80. Huen K, Calafat AM, Bradman A, Yousefi P, Eskenazi B, Holland N. Maternal phthalate exposure during pregnancy is associated with DNA methylation of LINE-1 and Alu repetitive elements in Mexican-American children. *Environ Res* [Internet]. 2016;148:55–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27019040>
 81. Zhao Y, Shi H, Xie C, Chen J, Laue H, Zhang Y. Prenatal phthalate exposure, infant growth, and global DNA methylation of human placenta. *Environ Mol Mutagen* [Internet]. 2015;56(3):286–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25327576>
 82. LaRocca J, Binder AM, McElrath TF, Michels KB. The impact of first trimester phthalate and

- phenol exposure on IGF2/H19 genomic imprinting and birth outcomes. *Environ Res* [Internet]. 2014;133:396–406. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24972507>
83. Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, Reproductive Disease and Sperm Epimutations. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(1):e55387. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0055387>
 84. Nye MD, Fry RC, Hoyo C, Murphy SK. Investigating Epigenetic Effects of Prenatal Exposure to Toxic Metals in Newborns: Challenges and Benefits. *Med epigenetics* [Internet]. 2014;2(1):53–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24955086>
 85. Soubry A, Hoyo C, Jirtle RL, Murphy SK. A paternal environmental legacy: Evidence for epigenetic inheritance through the male germ line. *BioEssays* [Internet]. 2014;36(4):359–71. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bies.201300113>
 86. Migicovsky Z, Kovalchuk I. Epigenetic memory in mammals. *Front Genet* [Internet]. 2011;2:1-7. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2011.00028/full>
 87. Matsushima W, Brink K, Schroeder J, Miska EA, Gapp K. Mature sperm small-RNA profile in the sparrow: implications for transgenerational effects of age on fitness. *Environ Epigenetics* [Internet]. 2019;5(2). Available from: <https://academic.oup.com/eep/article/doi/10.1093/eep/dvz007/5492486>
 88. Nilsson EE, Sadler-Riggelman I, Skinner MK. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Environ Epigenetics* [Internet]. 2018;4(2):1–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30038800>
 89. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2007;8(4):253–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17363974>
 90. Wang PX, Wang JJ, Lei YX, Xiao L, Luo ZC. Impact of Fetal and Infant Exposure to the Chinese Great Famine on the Risk of Hypertension in Adulthood. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(11):e49720. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23185416>
 91. Wang Y, Wang X, Kong Y, Zhang JH, Zeng Q. The Great Chinese Famine Leads to Shorter and Overweight Females in Chongqing Chinese Population After 50 Years. *Obesity* [Internet]. 2010;18(3):588–92. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2009.296>
 92. Barker DJP. In utero programming of cardiovascular disease. *Theriogenology* [Internet]. 2000;53(2):555–74. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X99002587?via%3Dihub>

93. Eriksson JG. Early growth, and coronary heart disease and type 2 diabetes: experiences from the Helsinki Birth Cohort Studies. *Int J Obes* [Internet]. 2006;30(4):18–22. Available from: <http://www.nature.com/articles/0803515>
94. Li Y, He Y, Qi L, Jaddoe VW, Feskens EJM, Yang X, et al. Exposure to the Chinese famine in early life and the risk of hyperglycemia and type 2 diabetes in adulthood. *Diabetes* [Internet]. 2010;59(10):2400–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20622161>
95. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2011;8(8):467–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21647195>
96. Honda M, Kuwano Y, Katsuura-Kamano S, Kamezaki Y, Fujita K, Akaike Y, et al. Chronic academic stress increases a group of microRNAs in peripheral blood. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(10):e75960. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130753>
97. Nature reviews. *Endocrinology*. [Internet]. Nature Pub. Group; [cited 2019 Apr 2]. Available from: <https://www.nature.com/collections/bgbvkwbrvk>
98. Bohacek J, Mansuy IM. Epigenetic inheritance of disease and disease risk. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2013;38(1):220–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2012.110>
99. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* [Internet]. 2005;308(5727):1466–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15933200>
100. Janesick A, Blumberg B. Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth Defects Res C Embryo Today* [Internet]. 2011;93(1):34–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21425440>
101. Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai L-H. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* [Internet]. 2007;447(7141):178–82. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature05772>
102. Arai JA, Li S, Hartley DM, Feig LA. Transgenerational Rescue of a Genetic Defect in Long-Term Potentiation and Memory Formation by Juvenile Enrichment. *J Neurosci* [Internet]. 2009;29(5):1496. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19193896>

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Antonija Antolović

Datum rođenja: 25. svibnja 1994.

Mjesto rođenja: Zagreb

e-mail: antonija.antolovic94@gmail.com

OBRAZOVANJE

2013.-2019. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet

2009.-2013. Gimnazija Tituša Brezovačkog, Zagreb

2001.-2009. Osnovna škola „Matija Gubec“, Zagreb

AKTIVNOSTI

2014./2015. demonstrator na Katedri za anatomiju i kliničku anatomiju

2017.-2019. član studentske pedijatrijske sekcije

2018./2019. član studentske ginekološke sekcije

CERTIFIKATI I PRIZNANJA

2015. BLS/AED certifikat

2016. pasivni sudionik 12. „Croatian student summit“ (CROSS 12)

2017. pasivni sudionik 13. „Croatian student summit“ (CROSS 13)

2018. pasivni sudionik 14. „Croatian student summit“ (CROSS 14)

2019. pasivni sudionik 15. „Croatian student summit“ (CROSS 15)

POSEBNA ZNANJA I VJEŠTINE

Aktivno korištenje engleskog jezika u govoru i pisanju (C1)

Osnovno korištenje njemačkog jezika u govoru i pisanju (A2)

Osnovno korištenje talijanskog jezika u govoru i pisanju (A1)

Osnovno korištenje španjolskog jezika u govoru i pisanju (A1)

Poznavanje rada na računalu (MS Office, Internet)