UNIVERZITET U NOVOM SADU

PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Uticaj perfluorooktanske kiseline i perfluorooktansulfonata na funkciju vaskularnih endotelnih ćelija čoveka u uslovima *in vitro*

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

dr Bojana Stanić

Kandidat:

Marija Kostić

Novi Sad, 2026. godine

Zahvalnica

Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki dr Bojani Stanić, na svom prenesenom znanju, trudu, posvećenosti, veri i ljubavi koju mi je svakodnevno pružala, a bez koje ova doktorska disertacija ne bi bila moguća. Hvala joj na neiscrpnom strpljenju, razmevanju, dragocenim savetima i rečima podrške koje su postale sinonim u radu sa njom. Hvala joj što je pored profesionalnog imala i majčinski prisup. Hvala na svim toplim, lepim i utešnim rečima koje su mi davale snagu u najizazovnijim trenucima. Takođe, dugujem joj posebnu zahvalnost na poverenju i ruci koju mi je pružila i pre nego me je upoznala, jer bez njene podrške nikada ne bih ušla u svet nauke.

Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Nebojši Andriću na prenesenom znanju, savetima, podršci i pomoći. Hvala na strpljenju, razumevanju i uvek smirenim i blagim rečima koje su sve probleme činile lakšim i jednostavnijim. Veliko hvala na prilici da postanem deo ovog tima.

Veliko hvala dr Dunji Kokai i Biljani Tešić što su bile uz mene u lepim i teškim trenucima, uvek spremne da pomognu, pruže podršku i oslonac. Zahvaljujući njima ova doktorska disertacija je još značajnija, jer je obogaćena jedinim iskrenim prijateljstvom.

Hvala dr Dragani Samardžiji Nenadov i Katarini Borković na pomoći i podršci u svakodnevnom radu. Hvala upućujem i dr Kristini Pogrmić-Majkić, dr Svetlani Fa Nedeljković, dr Savi Radović Pletikosić, dr Jeleni Marković Filipović, Ivani Ivelji i Jeleni Vukčević na sjajnoj saradnji, iskustvu i savetima.

Hvala članovima komisije prof. dr Nebojši Andriću, prof. dr Mladeni Lalić-Popović i dr Dariji Obradović Jovčić na korisnim savetima i sugestijama koji su pomogli u izradi ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem mami Slobodanki, tati Slobodanu, sestri Jeleni, i suprugu Vladimiru na bezuslovnoj ljubavi, podršci i veri. Veliko hvala jer ste uneli boje i radost u moj život i učinili da kroz ovaj put koračam sigurno, nasmejano i voljeno. Hvala vam što ste uvek bili tu za mene i činili da sve bude lepše i lakše. Bez vas, ovaj uspeh ne bi imao isti značaj.

Marija

UNIVERZITET U NOVOM SADU **OBRAZAC – 5a**
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA[1]

Vrsta rada:	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora:	Marija Kostić (rođ. Opačić)
mentor (titula, ime, prezime, zvanje, institucija):	dr Bojana Stanić, naučni savetnik, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
Naslov rada:	Uticaj perfluorooktanske kiseline i perfluorooktansulfonata na funkciju vaskularnih endotelnih ćelija čoveka u uslovima *in vitro*
Jezik i pismo rada:	Srpski, latinica
Fizički opis rada:	Uneti broj: Stranica 243 Poglavlja 9 Referenci 331 Tabela 15 Slika 63 Grafikona - Priloga 11
Naučna oblast:	Biologija
Uža naučna oblast (naučna disciplina):	Biologija ćelije
Ključne reči / predmetna odrednica:	PFOS, PFOA, endotelne ćelije, *in vitro*, PBTK, ekvivalentna doza za čoveka, odnos bioaktivne doze i izloženosti
Apstrakt na jeziku rada:	Per- i polifluoroalkilne supstance (PFAS) su grupa sintetičkih organskih jedinjenja čija upotreba datira od 1940-ih godina. Široko su zastupljene u brojnim proizvodima, spoljašnjoj sredini i organizmu čoveka, a zbog svoje perzistentnosti i otpornosti na degradaciju poznate su kao „večne hemikalije". Perfluorooktansulfonat (PFOS) i perfluorooktanska kiselina (PFOA) predstavljaju dva najzastupljenija i najviše istražena predstavnika ove grupe hemikalija. Iako je njihov negativan uticaj na nervni, reproduktivni i imunski sistem dobro istražen, uticaj na kardiovaskularni sistem nije u potpunosti razjašnjen. Cilj ove doktorske disertacije je da se ispitaju efekti kratkotrajnog izlaganja odabranim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e (1, 10 i 100 μM) na funkcijske i transkriptomske odgovore makrovaskularnih endotelnih ćelija čoveka u uslovima i*n vitro*, na modelu kontinuirane ćelijske linije EA.hy926, kao i da se izvrši kvantitativna procena njihovog potencijalnog rizika primenom integrisanog *in vitro–in silico* pristupa. Nakon 48 h izlaganja praćeni su funkcijski parametri EA.hy926 ćelija, a sekvenciranje iRNK je sprovedeno korišćenjem platforme DNBSEQ™. Rezultati su pokazali da kratkotrajno izlaganje PFOS-u dovodi do povećane adhezije endotelnih ćelija za fibronektin i smanjenog formiranja endotelnih tubula, praćeno smanjenjem ekspresije ključnih markera angiogeneze (VEGF-A, VEGFR-2 i PECAM1). Uočeno je da PFOS indukuje promene u genskoj ekspresiji, sa najvećim brojem diferencijalno eksprimiranih gena (DEG) identifikovanim pri najnižoj

[1] Autor doktorske disertacije potpisao je i priložio sledeće Obrasce:
5б – Izjava o autorstvu;
5в – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i dozvola za objavljivanje ličnih podataka;
5г – Izjava o korišćenju.
Ove Izjave se čuvaju u instituciji u štampanom i elektronskom obliku i ne koriče se sa radom.

	koncentraciji. Pokazano je da niže koncentracije utiču na regulatorne i signalne procese, dok su više koncentracije odgovorne za aktivaciju metaboličkih puteva povezanih sa detoksikacijom. Za razliku od PFOS-a, kratkotrajno izlaganje PFOA-i ne indukuje značajne funkcijske promene, ali indukuje izražen, koncentraciono-zavisan transkriptomski odgovor sa povećanjem broja DEG-ova sa porastom koncentracije. Pri nižim koncentracijama dominiraju promene u hromatinskoj organizaciji i regulaciji transkripcije, dok više koncentracije aktiviraju puteve razvoja, morfogeneze, metabolizma i remodelovanja ekstracelularnog matriksa. Integracijom transkriptomskih podataka sa toksikokinetičkim modelovanjem zasnovanim na fiziologiji čoveka izvršena je procena ekvivalentnih doza za čoveka (HED). Pokazano je da PFOA ispoljava veću toksikodinamičku potentnost na nivou transkriptoma u odnosu na PFOS (~40 puta). Geni sa najnižim vrednostima HED-ova (*HOMEZ*, *IRX3* i *FRRS1*) identifikovani su kao početne tačke za procenu rizika, sa dosledno niskim vrednostima odnosa bioaktivne doze i izloženosti (BER) kroz populacije. Analiza BER-ova ukazala je na postojanje visoke margine bezbednosti u opštim populacijama, dok su vrednosti BER-ova u profesionalno izloženim populacijama značajno niže, naročito za PFOA, što ukazuje na potencijalni rizik. Dobijeni rezultati ukazuju da PFOS i PFOA, uprkos ograničenim funkcijskim efektima u uslovima kratkotrajnog izlaganja, indukuju rane i biološki značajne transkriptomske promene u endotelnim ćelijama, koje mogu predstavljati osetljive biomarkere endotelne disfunkcije. Zbirno, rezultati doprinose boljem razumevanju molekulskih mehanizama delovanja PFAS i mogu predstavljati osnovu za dalja istraživanja i procenu rizika po zdravlje ljudi.
Datum prihvatanja teme od strane nadležnog veća:	18.04.2024.
Datum odbrane: (Popunjava naknadno institucija)	
Članovi komisije: (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	Predsednik: dr Nebojša Andrić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu Član: dr Mladena Lalić-Popović, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu Član: dr Darija Obradović Jovčić, viši naučni saradnik, Institut za fiziku Beograd, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Član: dr Bojana Stanić, naučni savetnik, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
Napomena:	

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES

KEY WORD DOCUMENTATION[2]

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Marija Kostic (née Opacic)
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Bojana Stanic, Ph.D., Senior Research Fellow, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Thesis title in English:	Impact of *in vitro* exposure to perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate on the function of human vascular endothelial cells
Language and script:	Serbian, Latin
Physical description:	Number of: Pages 243 Chapters 9 References 331 Tables 15 Illustrations 63 Graphs - Appendices 11
Scientific field:	Biology
Scientific subfield (scientific discipline):	Cell Biology
Subject, Key words:	PFOS, PFOA, endothelial cells, *in vitro*, PBTK, human equivalent dose, bioactive exposure ratio
Abstract in English:	Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) are a group of synthetic organic compounds whose use dates back to the 1940s. They are widely present in numerous consumer products, the environment, and the human body, and due to their persistence and resistance to degradation, they are commonly referred to as "forever chemicals". Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) are among the most prevalent and extensively studied members of this group. Although their adverse effects on the nervous, reproductive, and immune systems have been well documented, their impact on the cardiovascular system remains insufficiently understood. The aim of this doctoral dissertation was to investigate the effects of short-term exposure to selected concentrations of PFOS and PFOA (1, 10, and 100 μM) on the functional and transcriptomic responses of human macrovascular endothelial cells *in vitro*, using the EA.hy926 cell line, as well as to perform a quantitative risk assessment using an integrated *in vitro–in silico* approach. Following 48 h exposure, functional parameters of EA.hy926 cells were assessed, and mRNA sequencing was performed using the DNBSEQ™ platform. The results showed that short-term exposure to PFOS led to increased adhesion of endothelial cells to fibronectin and reduced tube formation, accompanied by decreased expression of key angiogenesis markers (VEGF-A, VEGFR-2, and PECAM1). PFOS also induced changes in gene expression, with the highest number of

[2] The author of the doctoral dissertation has signed the following Statements:
5б – Statement on the authorship,
5в – Statement that the printed and e-version of the doctoral dissertation are identical and authorization to use personal data,
5г – Copyright statement.
The paper and e-versions of Statements are held at the institution and are not included into the printed thesis.

	differentially expressed genes (DEGs) observed at the lowest concentration. Lower concentrations primarily affected regulatory and signaling processes, whereas higher concentrations activated metabolic pathways associated with detoxification. In contrast, short-term exposure to PFOA did not induce significant functional changes but elicited a pronounced, concentration-dependent transcriptomic response, characterized by an increasing number of DEGs with rising concentration. At lower concentrations, changes were mainly related to chromatin organization and transcriptional regulation, while higher concentrations activated pathways involved in development, morphogenesis, metabolism, and extracellular matrix remodeling. Integration of transcriptomic data with physiologically based toxicokinetic modeling enabled the estimation of human equivalent doses (HEDs). PFOA exhibited higher toxicodynamic potency at the transcriptomic level compared to PFOS (~40-fold). Genes with the lowest HED values (*HOMEZ*, *IRX3*, and *FRRS1*) were identified as points of departure for risk assessment, showing consistently low bioactivity exposure ratio (BER) values across populations. BER analysis indicated a high margin of safety in general populations, whereas significantly lower BER values were observed in occupationally exposed populations, particularly for PFOA, suggesting a potential risk. Overall, the results indicate that PFOS and PFOA, despite limited functional effects under short-term exposure conditions, induce early and biologically relevant transcriptomic changes in endothelial cells, which may serve as sensitive biomarkers of endothelial dysfunction. Collectively, these findings contribute to a better understanding of the molecular mechanisms underlying PFAS toxicity and may provide a basis for future research and human health risk assessment.
Date of endorsement by the scientific board:	April 18, 2024
Date of defence: (Filled in by the institution)	
Thesis defense board: (title, first name, last name, position, institution)	Chair: Nebojsa Andric, Ph.D., Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Member: Mladena Lalic-Popovic, Ph.D., Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad Member: Darija Obradovic Jovcic, Ph.D., Senior Research Associate, Institute of Physics Belgrade, a National Institute of the Republic of Serbia Member: Bojana Stanic, Ph.D., Senior Research Fellow, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Note:	

Skraćenice

ADME – apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje
ADI – prihvatljiv dnevni unos
AI – veštačka inteligencija
AOP – Adverse Outcome Pathway
AJ – adherentne međućelijske veze
Ang – angiopoetin
ATSDR – Agencija za toksične supstance i registar bolesti
AUC(0–t) – površina ispod krive koncentracija–vreme od 0 do t
BBB – krvno-moždana barijera
BER – odnos bioaktivne doze i izloženosti
BH_2 – 7,8-dihidrobiopterin
BH_4 – tetrahidrobiopterin
BMC – referentna koncentracija
BMCL – donja granica intervala pouzdanosti
BMCU – gornja granica intervala pouzdanosti
BMR – referentni odgovor
BPA – bisfenol A
BSA – albumin iz goveđeg seruma
CAM – ćelijski adhezivni molekul
CMAP – Connectivity Map
cGMP – ciklični guanozin-monofosfat
CL – bubrežni klirens
CTD – Komparativna baza toksikogenomskih podataka
Cmax – maksimalna koncentracija u tkivu ili plazmi
Css – ravnotežna koncentracija u plazmi
CYP – citohrom P450
DAF-FM DA – 4-amino-5-metilamino-2′,7′-difluorofluorescein diacetat
DCF – 2′,7′-dihlorofluorescein
DEG – diferencijalno eksprimirani geni
DEPC – dietilpirokarbonat
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO – dimetil-sulfoksid

DNBSEQ™ – DNA Nanoball Sequencing

DPTA NONOat – (Z)-1-[N-(3-aminopropil)-N-(3-amoniopropil)amino]diazen-1-ium-1,2-diolat

ECM – ekstracelularni matriks

ECHA – Evropska agencija za hemikalije

EDRF – opuštajući faktor endotelnog porekla

EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina

EFSA – Evropska agencija za bezbednost hrane

EM – elektronska mikroskopija

ENDOS – Laboratorija za ispitivanje endokrinih ometača i ćelijsku signalizaciju

eNOS – endotelna azot-monoksid sintaza

EPR – enhanced permeability and retention

ER – endoplazmatski retikulum

FBS – sterilni fetalni goveđi serum

FD40 – fluoresceinizotiocijanat-dekstran

FDR – false discovery rate

FGF – faktor rasta fibroblasta

FITC – fluoresceinizotiocijanat

G – opšta populacija

GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

GFR – brzina filtracije u bubrežnim glomerulima

GJ – komunikacijske međućelijske veze

GO – Gene Ontology

GSEA – Gene Set Enrichment Analysis

H_2DCF – 2′,7′-dihlorodihidrofluorescein

H_2DCFDA – 2′,7′-dihlorodihidrofluorescein-diacetat

HBMEC – humane mikrovaskularne endotelne ćelije mozga

HBSS – rastvor Hanks' Balanced Salt

HED – ekvivalentna doza za čoveka

HEPES – N-2-hidroksietilpiperazin-N-2-etansulfonska kiselina

HIF-1α – faktor indukovan hipoksijom 1 alfa

HMVEC – humane mikrovaskularne endotelne ćelije

HRP – peroksidaza rena

HTS – visokoprotočno testiranje

HTT – visokoprotočna transkriptomika
HUVEC – humane endotelne ćelije vene pupčane vrpce čoveka
IARC – Međunarodna agencija za istraživanje kancera
ICAM-1 – međućelijski adhezivni molekul 1
IGF-1 – faktor rasta sličan insulin 1
IL – interleukin
IVIVE – ekstrapolacija rezultata iz *in vitro* u *in vivo* uslove
JAM – spojni adhezivni molekuli
kDNK – komplementarna DNK
KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KVB – kardiovaskularne bolesti
KVS – kardiovaskularni sistem
LDL – lipoproteini male gustine
LINCS – Library of Integrated Network-based Cellular Signatures
LOAEL – najniža doza sa uočenim štetnim efektom
MCP-1 – protein hemoatraktant za monocite 1
ML – mašinsko učenje
NAM – novi metodološki pristupi
NF-κB – nuklearni faktor kapa-lakog lanca pojačivača aktiviranih B ćelija
NGS – sekvenciranje nove generacije
NMDR – nemonotono dozno-zavisan odgovor
NO – azot-monoksid
NO^+ – nitrozijum-jon
NOAEL – najviša doza bez uočenog štetnog efekta
NOS – azot-monoksid sintaza
Nrf2 – nuklearni faktor eritroid 2
O – profesionalno izložena populacija
$O_2^{\bullet-}$ – superoksid-anjon radikal
OAT – membranski transporteri organskih anjona
$ONOO^-$ – peroksinitrit
PBS – fiziološki rastvor puferisan fosfatnim puferom
PBTK – toksikokinetičko modelovanje zasnovano na fiziologiji čoveka
PECAM-1 – molekul endotelnih ćelija koji vezuje trombocite 1
PFA – paraformaldehid

PFAS – per- i polifluoroalkilne supstance
PFOA – perfluorooktanska kiselina
PFOS – perfluorooktansulfonat
PI – propidijum-jodid
PI3K – fosfatidilinozitol-3 kinaza
PMFUNS – Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu
PoD – početna tačka
PPARα/γ – receptor aktiviran peroksizomskim proliferatorom alfa/gama
PS – fosfatidilserin
PSA – analiza osetljivosti parametara
PTFE – politetrafluoroetilen
QC – provera kvaliteta
QSAR – Quantitative Structure Activity Relationship
QSPR – Quantitative Structure–Property Relationship
REACH – Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
RfD – referentna doza
RIN – broj koji ukazuje na integritet RNK
RNA-Seq – sekvenciranje iRNK
ROS – reaktivne vrste kiseonika
RSB – pufer sa redukujućim agensima
RT-qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu
SCHER – Naučni komitet za rizike po zdravlje i životnu sredinu
SDS – natrijumdodecil-sulfat
SEM – standardna greška srednje vrednosti
SRB – sulforodamin B
ssCirc – kružni jednolančani molekul
SULT – sulfotransferaze
TCA – trihlorsirćetna kiselina
TDI – tolerabilni dnevni unos
TEM – transendotelna migracija
TG-GATEs – Toxicogenomics Project – Genomics Assisted Toxicity Evaluation System
TGF-β – transformišući faktor rasta beta
TJ – čvrste međućelijske veze

TNF-α – faktor nekroze tumora alfa

tm – telesna masa

U.S. EPA – Agencija za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Američkih Država

URAT1 – transporter mokraćne kiseline 1

VCAM-1 – molekul adhezije vaskularnih ćelija 1

VE-kadherin – vaskularni endotelni kadherin

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta

VEGFR-2 – receptor 2 za vaskularni endotelni faktor rasta

VVO – vezikulo-vakuolarne organele

vWF – von Willebrand-ov faktor

WHO – Svetska zdravstvena organizacija

ZO – *zonula occludens*

3R – Replacement, Reduction, Refinement

SADRŽAJ

1. UVOD *1*

2. PREGLED LITERATURE *4*

2.1. Građa i funkcije vaskularnog endotela **4**

2.1.1. Propustljivost vaskularnog endotela 8

2.1.2. Vezivanje i promet leukocita kroz vaskularni endotel 12

2.1.3. Uloga azot-monoksida u regulaciji vaskularne homeostaze 15

2.1.4. Angiogeneza kao adaptivna funkcija vaskularnog endotela 17

2.2. Uticaj faktora iz spoljašnje sredine na nastanak i razvoj kardiovaskularnih bolesti **21**

2.3. Per- i polifluoroalkilne supstance **24**

2.3.1. Perfluorooktansulfonat 28

2.3.2. Perfluorooktanska kiselina 36

2.4. Novi metodološki pristupi u toksikološkim istraživanjima **43**

2.4.1. Toksikokinetičko modelovanje zasnovano na fiziologiji čoveka 46

2.4.2. Softverski alati u obradi toksikogenomskih podataka 49

3. CILJEVI *53*

4. MATERIJAL I METODE *54*

4.1. Hemikalije i antitela **54**

4.2. Gajenje ćelija u kulturi **55**

4.2.1. Ćelijska linija EA.hy926 55

4.2.2. Ćelijska linija U937 58

4.3. Izlaganje EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu i perfluorooktanskoj kiselini **59**

4.4. Ispitivanje vijabilnosti EA.hy926 ćelija testom sa bojom alamarBlue™ **60**

4.5. Određivanje udela EA.hy926 ćelija u apoptozi i nekrozi pomoću aneksina V i propidijum-jodida na protočnom citometru **61**

4.6. Određivanje udela EA.hy926 ćelija u fazama ćelijskog ciklusa pomoću propidijum-jodida na protočnom citometru **64**

4.7. Ispitivanje migracije EA.hy926 ćelija u Transwell® sistemu **67**

4.8. Ispitivanje adhezije EA.hy926 ćelija za ekstracelularni matriks **69**

4.9. Određivanje broja EA.hy926 ćelija testom sa bojom sulforodamin B **71**

4.10. Određivanje angiogeneze EA.hy926 ćelija **72**

4.11. Ispitivanje vezivanja monocita za monosloj EA.hy926 ćelija **74**

4.12. Ispitivanje propustljivosti monosloja EA.hy926 ćelija u Transwell® sistemu **75**

4.13. Određivanje koncentracije proteina u EA.hy926 ćelijama metodom Pierce™ BCA **77**

4.14. Određivanje ekspresije i fosforilacije proteina u EA.hy926 ćelijama metodom Western blot **77**

4.14.1. Priprema uzoraka za elektroforezu ... 78
4.14.2. Elektroforeza, transfer proteina na membranu, detekcija i kvantifikacija proteina ... 79

4.15. Određivanje nivoa reaktivnih vrsta kiseonika u EA.hy926 ćelijama pomoću reagensa H_2DCFDA ... **80**

4.16. Određivanje nivoa azot-monoksida u EA.hy926 ćelijama pomoću reagensa DAF-FM DA ... **81**

4.17. Relativna kvantifikacija ekspresije gena u EA.hy926 ćelijama metodom RT-qPCR ... **83**
4.17.1. Priprema uzoraka i izolacija ukupne RNK ... 83
4.17.2. Reverzna transkripcija ... 84
4.17.3. Kvantitativna RT-PCR analiza ... 85

4.18. Sekvenciranje iRNK u EA.hy926 ćelijama ... **86**
4.18.1. Priprema uzoraka za sekvenciranje iRNK ... 87
4.18.2. Sekvenciranje iRNK primenom platforme DNBSEQ™ ... 88
4.18.3. Filtracija podataka i analiza diferencijalno eksprimiranih gena ... 89

4.19. Identifikacija molekulskih funkcija i bioloških procesa u EA.hy926 ćelijama korišćenjem alata ShinyGO ... **91**

4.20. Modelovanje referentnih koncentracija ... **92**

4.21. Toksikokinetičko modelovanje zasnovano na fiziologiji čoveka ... **93**
4.21.1. Izračunavanje ekvivalentne doze za čoveka za perfluorooktansulfonat ... 93
4.21.2. Izračunavanje ekvivalentne doze za čoveka za perfluorooktansku kiselinu ... 94

4.22. Izračunavanje odnosa bioaktivne doze i izloženosti ... **97**

4.23. Statistička analiza ... **97**

5. REZULTATI ... ***99***

5.1. Efekti kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu ... **99**
5.1.1. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na vijabilnost EA.hy926 ćelija ... 99
5.1.2. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na broj EA.hy926 ćelija u apoptozi i nekrozi ... 99
5.1.3. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na ćelijski ciklus u EA.hy926 ćelijama ... 101
5.1.4. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na migraciju EA.hy926 ćelija ... 102
5.1.5. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na adheziju EA.hy926 ćelija za ekstracelularni matriks ... 103
5.1.6. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na angiogenezu EA.hy926 ćelija ... 104
5.1.7. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na relativnu ekspresiju gena za odabrane proteine uključene u regulaciju angiogeneze u EA.hy926 ćelijama ... 105
5.1.8. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na vezivanje monocita za monosloj EA.hy926 ćelija ... 106
5.1.9. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule u EA.hy926 ćelijama ... 107
5.1.10. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na propustljivost monosloja EA.hy926 ćelija ... 107
5.1.11. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na ekspresiju okludina i ZO-1 u EA.hy926 ćelijama ... 108

5.1.12. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na nivo reaktivnih vrsta kiseonika u EA.hy926 ćelijama 109
5.1.13. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na nivo azot-monoksida u EA.hy926 ćelijama 110
5.1.14. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na relativnu ekspresiju gena za endotelnu azot-monoksid sintazu u EA.hy926 ćelijama 111
5.1.15. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na ekspresiju i fosforilaciju endotelne azot-monoksid sintaze u EA.hy926 ćelijama 111
5.1.16. Identifikacija diferencijalno eksprimiranih gena u EA.hy926 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu 112
5.1.17. Identifikacija molekulskih funkcija povezanih sa diferencijalno eksprimiranim genima u EA.hy926 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu 119
5.1.18. Identifikacija bioloških procesa povezanih sa diferencijalno eksprimiranim genima u EA.hy926 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu 120
5.1.19. Modelovanje referentnih koncentracija nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu 121
5.1.20. Modelovanje ekvivalentne doze za čoveka nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu 123
5.1.21. Procena rizika izloženosti perfluorooktansulfonatu za različite populacije zasnovana na promenama u ekspresiji gena u endotelnim ćelijama 124

5.2. Efekti kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini 128
5.2.1. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na vijabilnost EA.hy926 ćelija 128
5.2.2. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na broj EA.hy926 ćelija u apoptozi i nekrozi 128
5.2.3. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na ćelijski ciklus u EA.hy926 ćelijama 130
5.2.4. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na migraciju EA.hy926 ćelija 131
5.2.5. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na adheziju EA.hy926 ćelija za ekstracelularni matriks 132
5.2.6. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na angiogenezu EA.hy926 ćelija 132
5.2.7. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na relativnu ekspresiju gena za odabrane proteine uključene u regulaciju angiogeneze u EA.hy926 ćelijama 134
5.2.8. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na vezivanje monocita za monosloj EA.hy926 ćelija 134
5.2.9. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule u EA.hy926 ćelijama 135
5.2.10. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na propustljivost monosloja EA.hy926 ćelija 136
5.2.11. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na ekspresiju okludina i ZO-1 u EA.hy926 ćelijama 137
5.2.12. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na nivo reaktivnih vrsta kiseonika u EA.hy926 ćelijama 137
5.2.13. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na nivo azot-monoksida u EA.hy926 ćelijama 138
5.2.14. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na relativnu ekspresiju gena za endotelnu azot-monoksid sintazu u EA.hy926 ćelijama 139

5.2.15. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na fosforilaciju endotelne azot-monoksid sintaze u EA.hy926 ćelijama ... 140
5.2.16. Identifikacija diferencijalno eksprimiranih gena u EA.hy926 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini ... 141
5.2.17. Identifikacija molekulskih funkcija povezanih sa diferencijalno eksprimiranim genima u EA.hy926 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini ... 147
5.2.18. Identifikacija bioloških procesa povezanih sa diferencijalno eksprimiranim genima u EA.hy926 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini ... 149
5.2.19. Modelovanje referentnih koncentracija nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini ... 150
5.2.20. Modelovanje ekvivalentne doze za čoveka nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini ... 152
5.2.21. Procena rizika izloženosti perfluorooktanskoj kiselini za različite populacije zasnovana na promenama u ekspresiji gena u endotelnim ćelijama ... 153

6. DISKUSIJA ... ***157***

6.1. Efekti kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu u EA.hy926 ćelijama ... **158**
6.1.1. Funkcijski odgovori EA.hy926 ćelija nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu ... 158
6.1.2. Transkriptomski odgovori EA.hy926 ćelija nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu ... 164

6.2. Efekti kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini u EA.hy926 ćelijama ... **170**
6.2.1. Funkcijski odgovori EA.hy926 ćelija nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini ... 171
6.2.2. Transkriptomski odgovori EA.hy926 ćelija nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini ... 176

6.3. Integracija transkriptomskih podataka i PBTK modelovanja u proceni rizika perfluorooktansulfonata i perfluorooktanske kiseline ... **184**

7. ZAKLJUČCI ... ***190***

8. LITERATURA ... ***193***

9. PRILOZI ... ***230***

Prilog 1. Parametri kvaliteta RNK sekvenciranih uzoraka ... **230**

Prilog 2. Statistika podataka sekvenciranja RNK svih uzoraka ... **231**

Prilog 3. Stopa poravnanja RNK sekvenciranih uzoraka na referentni genom i referentne gene ... **232**

Prilog 4. Distribucija očitavanja duž transkripata sekvenciranih uzoraka ... **233**

Prilog 5. Pokrivenost transkripata očitavanjima za sve sekvencirane uzorke ... **235**

Prilog 6. Analiza zasićenja sekvenciranja za sve sekvencirane uzorke ... **237**

Prilog 7. Profili koncentracije perfluorooktanske kiseline u plazmi kroz vreme: poređenje posmatranih podataka sa predikcijama PBTK modela ... **239**

Prilog 8. Analiza osetljivosti parametara (PSA) PBTK modela za perfluorooktansku kiselinu ... **240**

Prilog 9. Poređenje posmatranih i PBTK modelom predviđenih koncentracija perfluorooktanske kiseline u plazmi kroz vreme nakon primene doze od 100 mg 241

Prilog 10. Definicije kohorti i izvori podataka korišćenih za procenu izloženosti perfluorooktansulfonatu u opštim (G1–G11) i profesionalno izloženim populacijama (O1–O5) 242

Prilog 11. Definicije kohorti i izvori podataka korišćenih za procenu izloženosti perfluorooktanskoj kiselini u opštim (G1–G9) i profesionalno izloženim populacijama (O1–O5) 243

1. UVOD

Kardiovaskularne bolesti (KVB) predstavljaju vodeći uzrok mortaliteta širom sveta i jedan od najznačajnijih izazova savremenog društva kada je u pitanju javno zdravlje. Iako su tradicionalni faktori rizika kao što su hipertenzija, dislipidemija, dijabetes i način života dobro definisani, poslednjih decenija sve veća pažnja usmerena je na ulogu hemikalija iz radnog i životnog okruženja u nastanku i progresiji ovih oboljenja. U tom kontekstu, vaskularni endotel zauzima centralno mesto, jer predstavlja dinamičan i metabolički aktivan organ koji reguliše vaskularni tonus, propustljivost, inflamacijski odgovor i angiogenezu. Endotelne ćelije su istovremeno i primarno mesto kontakta sa cirkulišućim ksenobioticima, zbog čega njihova disfunkcija predstavlja jedan od najranijih događaja u razvoju KVB.

Među hemikalijama koje su u fokusu savremenih istraživanja posebno se izdvajaju per- i polifluoroalkilne supstance (engl. *per- and polyfluoroalkyl substances*, PFAS). PFAS su velika grupa sintetičkih organskih jedinjenja koja se odlikuju izuzetnom hemijskom i termičkom stabilnošću, kao i otpornošću na biološku degradaciju. Zbog ovih svojstava široko su primenjivane u industriji i potrošačkim proizvodima od sredine XX veka, ali istovremeno pokazuju izraženu perzistentnost i sklonost ka bioakumulaciji u životnoj sredini i organizmu čoveka, zbog čega su poznate i kao „večne hemikalije“. Danas su PFAS detektovane u krvi većine ljudi, kao i u različitim ekološkim matricama, što ukazuje na njihovu globalnu rasprostranjenost i kontinuiranu izloženost populacije. Najzastupljeniji i najviše istraženi predstavnici ove grupe su perfluorooktansulfonat (engl. *perfluorooctane sulfonate*, PFOS) i perfluorooktanska kiselina (engl. *perfluorooctanoic acid*, PFOA). Brojne epidemiološke i eksperimentalne studije ukazale su na povezanost izloženosti ovim jedinjenjima sa poremećajima u nervnom, imunskom, endokrinom, reproduktivnom i kardiovaskularnom sistemu (KVS). U kontekstu kardiovaskularnih efekata, sve je više dokaza da PFAS mogu doprineti razvoju endotelne disfunkcije putem indukcije oksidativnog stresa, inflamacije i poremećaja signalnih puteva. Ipak, uprkos rastućem broju istraživanja, molekularni mehanizmi delovanja PFOS-a i PFOA-e na endotelne ćelije, naročito na nivou globalne ekspresije gena, i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni, posebno kada je reč o ranim, koncentraciono-zavisnim odgovorima nakon kratkotrajne izloženosti.

Savremena toksikološka istraživanja sve više se oslanjaju na primenu novih metodoloških pristupa (engl. *new approach methodologies*, NAM), koji omogućavaju detaljnije razumevanje bioloških efekata hemikalija uz smanjenje potrebe za *in vivo*

eksperimentima. U tom smislu, toksikogenomika, kao pristup koji obuhvata analizu promena u ekspresiji velikog broja gena, pruža mogućnost identifikacije ranih molekulskih događaja koji prethode fenotipskim promenama. Međutim, jedan od ključnih izazova primene *in vitro* modela jeste njihova ograničena translaciona vrednost, odnosno nemogućnost direktnog povezivanja eksperimentalnih koncentracija sa realnim nivoima izloženosti kod ljudi. Kako bi se prevazišlo ovo ograničenje, razvijeni su integrisani *in vitro–in silico* pristupi koji kombinuju eksperimentalne podatke sa toksikokinetičkim modelovanjem zasnovanim na fiziologiji čoveka (engl. *physiologically based toxicokinetic modeling*, PBTK). Ovakav pristup omogućava primenu reverzne dozimetrije i prevođenje efektivnih koncentracija dobijenih u uslovima *in vitro* u ekvivalentne doze za čoveka (engl. *human equivalent dose*, HED), čime se uspostavlja direktna veza između molekulskih odgovora i realnih scenarija izloženosti. Time se značajno unapređuje interpretacija rezultata i njihova primena u proceni rizika na nivou populacije.

U ovoj doktorskoj disertaciji primenjen je integrisani pristup u cilju ispitivanja efekata kratkotrajnog izlaganja PFOS-u i PFOA-i na funkcijske i transkriptomske odgovore makrovaskularnih endotelnih ćelija čoveka u uslovima *in vitro*. Poseban fokus stavljen je na identifikaciju ranih molekulskih promena, modelovanje dozno-zavisnih odgovora i njihovu kvantitativnu translaciju u HED-ove, kao i procenu potencijalnog rizika u različitim populacijama. Na ovaj način omogućeno je sveobuhvatnije sagledavanje biološkog delovanja PFAS i bolje razumevanje njihove potencijalne uloge u razvoju endotelne disfunkcije i KVB.

Rezultati ovog istraživanja doprinose unapređenju savremenih strategija procene rizika, jer omogućavaju povezivanje molekulskih biomarkera sa realnim nivoima izloženosti, identifikaciju osetljivih bioloških procesa i razvoj modela relevantnih za čoveka. Istovremeno, ovakav pristup predstavlja važan korak ka razvoju održivih toksikoloških metodologija u skladu sa principima smanjenja upotrebe eksperimentalnih životinja u istraživanjima.

Istraživanje je sprovedeno u Laboratoriji za ispitivanje endokrinih ometača i ćelijsku signalizaciju (ENDOS) na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu (PMFUNS). Deo istraživanja koji se odnosi na PFOS sproveden je u okviru Programa Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija kojim se finansira nauka u naučnoistraživačkim organizacijama u Srbiji, dok je deo koji se odnosi

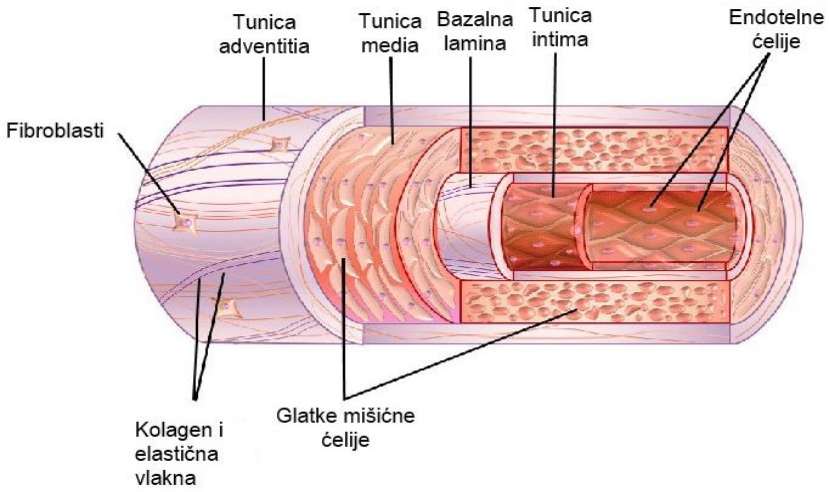
na PFOA-u sproveden u okviru projekta „Integration of Biological Responses and PBTK Modeling in Chemical Toxicity Assessment: A Case Study of Perfluorooctanoic Acid (PFOA)”, akronim ToxIN, #7010, finansiranog od strane Fonda za nauku Republike Srbije, poziv PRIZMA. Za sadržinu ove publikacije isključivo je odgovoran PMFUNS i ta sadržina ne izražava stavove Fonda za nauku Republike Srbije.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Građa i funkcije vaskularnog endotela

Kardiovaskularni sistem se sastoji od srca, arterija, kapilara i vena. Srce i krvni sudovi obezbeđuju stalan, neprekidan protok krvi kroz telo. KVS omogućava razmenu gasova i metabolita između krvi i tkiva, transport hormona, hranljivih materija, ćelija, molekula imunskog sistema, antigena i faktora rasta. Pored toga, KVS ima ulogu u regulaciji telesne temperature i procesu koagulacije krvi (Anđelković i sar., 2009).

Krvni sudovi predstavljaju cevaste strukture, čiji su zidovi, osim kod kapilara, troslojne građe (slika 2.1). Idući od lumena u vaskularnom zidu arterija i vena razlikuju se tri osnovna sloja: *tunica intima* (*interna*), *tunica media* i *tunica adventitia* (*externa*). *Tunica intima* se sastoji od jednosloja endotelnih ćelija, bazalne membrane i subendotelnog vezivnog tkiva. *Tunica media* sačinjena je od glatkih mišićnih ćelija, proteoglikana, elastičnih i kolagenih vlakana koja su u zavisnosti od vrste krvnog suda zastupljena u različitom odnosu. Kod arterija je *tunica media* znatno deblja nego kod vena jer sadrži više glatkog mišićnog tkiva. *Tunica adventitia* ima značajnu mehaničku funkciju. Sačinjena je od rastresitog vezivnog tkiva, dužno orijentisanih kolagenih i elastičnih vlakana, limfnih i krvnih sudova, amijelinskih nervnih vlakana i fibrocita, dok se kod vena srednjeg promera u adventiciji mogu naći i longitudinalno orijentisane glatke mišićne ćelije. Zidovi kapilara sastoje se od sloja endotelnih ćelija koje naležu na bazalnu membranu i poneke pericite (Anđelković i sar., 2009; Ng i sar., 2018).



Slika 2.1. Građa krvnog suda. Preuzeto uz modifikacije iz Ng i saradnici (2018).

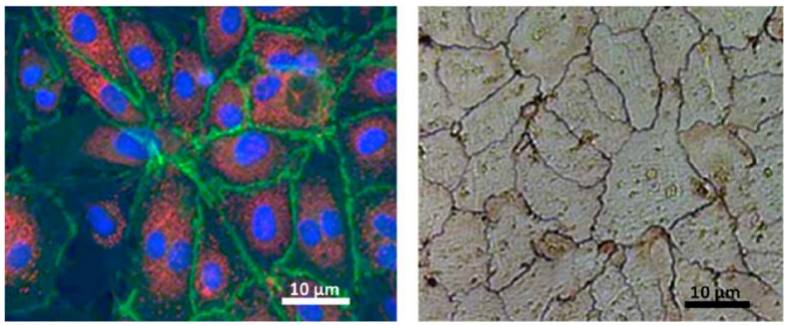
Termin “endotel” uveo je švajcarski anatom Wilhelm His 1865. godine, kako bi razlikovao unutrašnju oblogu telesnih šupljina od epitela. Prvobitna definicija obuhvatala je ćelijsku oblogu krvnih sudova, limfnih sudova i šupljina obloženih mezotelom. Kasnije je definicija sužena tako da uključuje samo unutrašnji ćelijski sloj krvnih i limfnih sudova (Aird, 2007). Sredinom XX veka, primena elektronske mikroskopije (EM) omogućila je detaljniji uvid u endotel. Rane EM studije otkrile su prisustvo karakterističnih organela, a pored toga, po prvi put je uočena strukturna heterogenost endotelnih ćelija. Zapaženo je da su u pojedinim vaskularnim strukturama endotelne ćelije čvrsto povezane i okružene kontinuiranom bazalnom membranom (kontinuirani endotel), dok su u podskupu ovih struktura ćelije prošarane otvorima, tzv. fenestrama (fenestrirani endotel). Treći tip endotela odlikuje prisustvo fenestri, izraženih procepa i slabo formirane bazalne membrane (diskontinuirani endotel). Na osnovu celokupnog do tada akumuliranog znanja o endotelnim ćelijama, lord Florey je 1966. godine okarakterisao endotel kao “celofansku opnu sa jedrima” koja u tankom sloju oblaže unutrašnjost krvnih sudova, pri čemu je izneo važno zapažanje da „(…) postoji mnogo tipova endotelnih ćelija koje se međusobno znatno razlikuju po građi, a donekle i po funkciji” (Florey, 1966). Danas je, međutim, poznato da su i struktura i funkcija endotela znatno kompleksniji nego što se prvobitno pretpostavljalo. Naime, endotel ne predstavlja samo pasivnu, polupropustljivu barijeru koja omogućava selektivni prolazak molekula, hormona, jona, vode, ćelija i patogena između krvi i okolnog tkiva, već funkcioniše kao izuzetno dinamičan i kompleksan organ. Pored osnovne uloge u razmeni materija, endotel aktivno učestvuje u regulaciji tonusa krvnih sudova, kontroli protoka krvi, distribuciji kiseonika, kao i u procesima inflamacije, imunskog odgovora i neovaskularizacije (Galley i Webster, 2004; Incalza i sar., 2018).

U strukturnom pogledu, endotel predstavlja prost pločasti epitel, sačinjen od jednog sloja pljosnatih poligonalnih endotelnih ćelija koje naležu na bazalnu membranu. Endotelne ćelije u citoplazmi sadrže jedro, granulirani endoplazmatski retikulum (ER) i glatki ER, Goldžijev kompleks, mitohondrije, lizozome, polizome i pinocitozne vezikule. Poseduju citoskelet tj. mikrofilamente koji omogućavaju kontrakcije endotelnih ćelija koje, po potrebi, dovode do privremenog raskidanja čvrstih (engl. *tight junctions*, TJ) i adherentnih (engl. *adherens junctions*, AJ) veza i formiranja intercelularnih pukotina. U citoplazmi endotelnih ćelija nalaze se i vimentinski intermedijarni filamenti i mikrotubule. Glavna ultrastrukturna odlika endotelnih ćelija su Weibel-Palade-ova telašca koja sadrže von Willebrand-ov faktor (vWF), azot-monoksid (NO) sintazu (NOS), histamin, endotelin, P-selektin, interleukin (IL)

8 (IL-8) i druge supstance. Supstance Weibel-Palade-ovih telašaca su uključene u procese hemostaze, koagulacije krvi, regulacije protoka krvi u organizmu, adhezije leukocita i inflamacije. Na apikalnoj površini endotelnih ćelija nalaze se glikokaliks i mikrovili. Lateralne površine endotelnih ćelija karakteriše prisustvo TJ, AJ i komunikacijskih (engl. *gap junctions*, GJ) međućelijskih veza. Bazalni deo endotelnih ćelija je preko integrina vezan za bazalnu membranu i tu se uspostavljaju dve vrste veza: fokalna adhezija i hemidezmozomi. Bazalni odeljak karakteriše i prisustvo mioendotelnih veza čiji značaj nije u potpunosti razjašnjen. Moguće je da se preko mioendotelnih veza transportuje angiotenzin iz plazme do mišićnih ćelija. Angiotenzin uzrokuje kontrakciju mišićnih ćelija i posledično povećanje krvnog pritiska (Anđelković i sar., 2009).

Bazalna membrana predstavlja tanak sloj ekstracelularnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM) koji odvaja endotelne ćelije od subendotelnog tkiva. Sastoji se od bazalne lamine i retikularne lamine. Ispod bazalne membrane smešten je subendotelni sloj koji se sastoji od rastresitog vezivnog tkiva, a zavisno od vrste i promera krvnog suda sadrži još i glatke mišićne ćelije (Anđelković i sar., 2009).

Oblik endotelnih ćelija zavisi od vrste krvnog suda, te s tim u vezi mogu imati drugačiju strukturu i fenotip. Endotelne ćelije u arterijama i venama su više, a veze između njih uže u poređenju sa endotelnim ćelijama u kapilarima, koje su niže, a pukotine između njih šire, kako bi se omogućila nesmetana razmena metabolita i gasova (Krüger-Genge i sar., 2019). Ipak, uopšteno posmatrano, sve vaskularne endotelne ćelije imaju sličan oblik, tanke su i blago izdužene po osi krvnog suda. Dimenzija su oko 30-50 µm u dužinu i 10-30 µm u širinu, debljine oko 0,1-10 µm. Ćelije su izdužene spram ose krvnog suda zbog smanjenja pritiska usled proticanja krvi kroz krvni sud (Krüger-Genge i sar., 2019). Monosloj endotelnih ćelija u uslovima *in vitro* ima oblik kaldrme, kao što je prikazano na slici 2.2.



Slika 2.2. Levo – Imunofluorescentno bojenje jednosloja endotelnih ćelija (jedra – plavo; von Willebrand-ov faktor – crveno; vinkulin – zeleno). Desno – Granice endotelnih ćelija u konfluentnom

monosloju obojene po Ranvier-u $AgNO_3$; uvećanje 400×. Preuzeto iz Krüger-Genge i saradnici (2019).

Endotelne ćelije pokazuju izraženu fenotipsku heterogenost i specifične funkcije koje zavise od njihove anatomske lokacije unutar vaskularnog sistema (Aird, 2007). Kao što je već navedeno, endotel može biti kontinuiran ili diskontinuiran. Kontinuirani endotel se dalje deli na fenestrirani i nefenestrirani. Nefenestrirani kontinuirani endotel se nalazi u arterijama, venama i kapilarima mozga, kože, srca i pluća. Fenestrirani kontinuirani endotel se javlja u tkivima sa pojačanom filtracijom ili transendotelnim transportom, uključujući kapilare egzokrinih i endokrinih žlezda, sluzokožu želuca i creva, horoidni splet (lat. *plexus choroideus*), glomerule i pojedine populacije bubrežnih tubula. Fenestre su transcelularne pore (~70 nm u prečniku) koje se protežu kroz celu debljinu ćelije. Većina fenestri poseduje tanku nemembransku dijafragmu debljine 5–6 nm koja premošćuje njihov otvor (Rostgaard i Qvortrup, 1997). Diskontinuirani endotel se nalazi u pojedinim sinusoidnim vaskularnim strukturama, naročito u jetri. Za razliku od fenestriranog kontinuiranog endotela, endotelne ćelije jetrenih sinusoida imaju veće fenestre (100–200 nm u prečniku) koje nemaju dijafragmu i sadrže procepe (odnosno velike kružne pore) unutar pojedinačnih ćelija. Bazalna membrana ispod endotela je slabo formirana (Wisse, 1970).

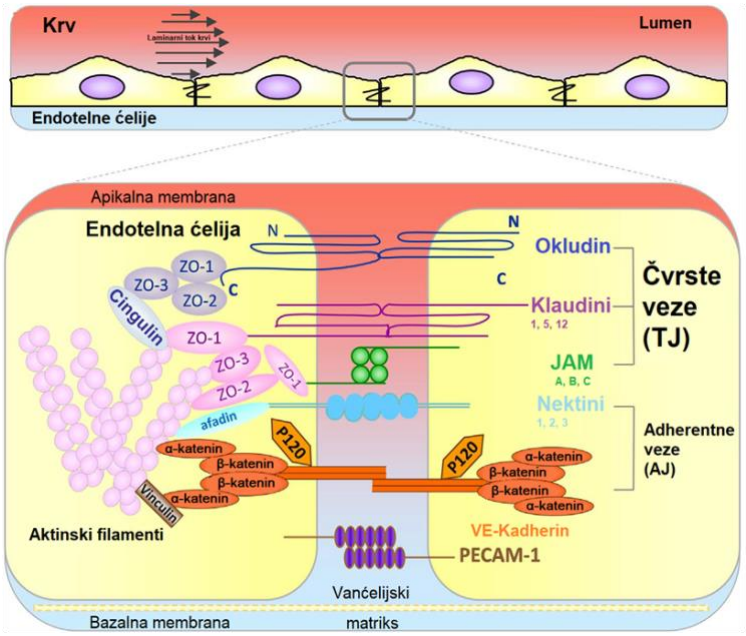
Vaskularne endotelne ćelije obavljaju brojne fiziološke funkcije, pri čemu se većina njih ostvaruje u specifičnim tipovima krvnih sudova. Najvažnije funkcije su: regulacija vaskularne homeostaze (Deanfield i sar., 2007), kontrola vaskularnog tonusa i signalizacija preko NO-a (Vanhoutte i sar., 2009), inhibicija agregacije trombocita i hemostaza (Rosenberg i Aird, 1999), modulacija migracije leukocita i inflamacije (Ley i sar., 2007; Muller, 2011), regulacija proliferacije glatkih mišićnih ćelija (Ross, 1999), i modulacija permeabilnosti zidova krvnih sudova (Mehta i Malik, 2006). Dakle, u normalnim fiziološkim uslovima endotel ispoljava antiinflamacijsko, antikoagulacijsko i antiproliferacijsko dejstvo i na taj način kontroliše vazodilataciju i vazokonstrikciju krvnih sudova, trombogenezu, fibrinolizu, aktivaciju i inhibiciju trombocita (Stanek i sar., 2018).

U nastavku će biti razmatrani reprezentativni primeri: propustljivost endotela, vezivanje i promet (migracija i transmigracija) leukocita, stvaranje NO-a i angiogeneza. Druge funkcije, poput endotelne regulacije vazomotornog tonusa, hemostaze, te urođenog i stečenog imuniteta, nisu ništa manje važne, ali zbog ograničenog prostora i teme doktorske disertacije ovde neće biti razmatrane.

2.1.1. Propustljivost vaskularnog endotela

Vaskularni endotel predstavlja polupropustljivu barijeru koja omogućava regulisan prenos tečnosti i rastvorenih supstanci između krvi i intersticijuma. Razlikuju se dve kategorije propustljivosti: bazalna (konstitutivna) i indukovana. U bazalnim uslovima postoji kontinuiran, fiziološki regulisan protok materija između krvi i okolnog tkiva, koji se najvećim delom odvija u kapilarima. Još je Pappenheimer istakao da je „nevidljivi" tok vode i rastvorenih supstanci kroz kapilarne zidove višestruko veći od zapremine srčanog minutnog volumena, te da upravo ova „ultramikroskopska cirkulacija" omogućava vaskularnom sistemu da ispuni svoju krajnju funkciju – dostavu potrebnih supstanci do svih ćelija u organizmu, kao i odnošenje štetnih i/ili nepotrebnih supstanci od ćelija (Pappenheimer, 1953).

Vaskularne endotelne ćelije učestvuju u izgradnji polupropustljive barijere koja odvaja krv od okolnih organa i tkiva, kontrolišući na taj način prolazak tečnosti, rastvorenih supstanci i ćelija kroz zidove krvnih sudova. Selektivna propustljivost vaskularne endotelne barijere zavisi od prisustva tri tipa ranije spomenutih međućelijskih veza: TJ, AJ i GJ. TJ imaju ulogu "barijere" između dve endotelne ćelije. Odgovorne su za održavanje homeostaze, regulišu paracelularnu propustljivost, preko kontrole transporta tečnosti, jona i malih proteina. Imaju ulogu u održavanju polarnosti ćelija putem sprečavanja difuzije apikalnih i bazolateralnih membranskih proteina i lipida (Cong i Kong, 2020). Nalaze se uglavnom na apikalnim regionima ćelija i bolje su razvijene u arterijama, nego u venama. Zahvaljujući sposobnosti prenošenja signala učestvuju u regulaciji proliferacije, diferencijacije i apoptoze. U sastav TJ (slika 2.3) ulaze transmembranski proteini klaudini, najviše klaudin-5, okludini, tricelulini i spojni adhezivni molekuli (engl. *junctional adhesion molecules*, JAM). Okludini i klaudini povezani su sa citoplazmatskim proteinima poput *zonula occludens* (ZO-1, ZO-2 i ZO-3) i cingulinom, i posreduju u interakciji između adhezivnih molekula i aktinskog citoskleta (Wallez i Huber, 2008; Cerutti i Ridley, 2017; Cong i Kong, 2020).



Slika 2.3. Šematski prikaz molekulske strukture čvrstih i adherentnih međućelijskih veza. JAM – spojni adhezivni molekul; PECAM-1 – molekul endotelnih ćelija koji vezuje trombocite 1; VE-kadherin – vaskularni endotelni kadherin; ZO – *zonula occludens*. Preuzeto uz modifikacije iz Cerutti i Ridley (2017).

Adherentne veze se formiraju posredstvom transmembranskih adhezivnih proteina iz porodice kadherina (slika 2.3). Endotelne ćelije karakteriše prisustvo vaskularnog endotelnog kadherina (engl. *vascular endothelial cadherin*, VE-kadherin), koji je specifičan za ovaj tip ćelija. Pored VE-kadherina, na površini ćelijske membrane prisutan je i difuzno raspoređen N-kadherin, koji omogućava komunikaciju endotelnih ćelija sa glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova, pericitama i ECM-om (Sluiter i sar., 2021). AJ obezbeđuju čvrste mehaničke veze između susednih ćelija. Imaju važnu ulogu u procesima kontaktne inhibicije rasta endotelnih ćelija, regulišu propustljivost za leukocite i supstance iz krvotoka, te učestvuju u organizaciji vaskularne mreže za vreme angiogeneze. VE-kadherin je preko citoplazmatskog dela povezan sa aktinskim filamentima pomoću kompleksa proteina koji uključuje α- i β-katenin, vinkulin i α-aktinin, što je od suštinske važnosti za stabilnost veza (Bazzoni i Dejana, 2004; Wallez i Huber, 2008; Cong i Kong, 2020). GJ, koje su uglavnom lokalizovane na luminalnoj strani endotela, izgrađene su od koneksinskih transmembranskih kanala i omogućavaju direktnu komunikaciju između ćelija putem prenosa jona i molekula male molekulske mase. Koneksini 43, 30 i 37 formiraju strukture poznate kao koneksoni, koji funkcionišu kao kanali za prolazak malih molekula i omogućavaju komunikaciju između ćelija (Bazzoni i Dejana, 2004; Sluiter i sar., 2021). Pored toga, u održavanju

integriteta endotelne barijere učestvuju i brojni adhezivni molekuli, povezani sa aktinskim citoskletom, kao što su molekul endotelnih ćelija koji vezuje trombocite 1 (engl. *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, PECAM-1) i nektin (slika 2.3).

Transport različitih molekula kroz endotel odvija se paracelularnim i transcelularnim putem. Voda, joni i mali hidrofilni molekuli prolaze kroz endotel pretežno paracelularnim putem, dok mali lipofilni molekuli mogu prolaziti transcelularno, direktno kroz endotelne ćelije. Nasuprot tome, makromolekuli se tokom transcelularnog transporta najčešće prenose pomoću membranskih vezikularnih nosača, uključujući kaveole i vezikulo-vakuolarne organele (VVO), kao i kanale nastale spajanjem vezikula (transendotelni kanali). Transcelularni transport može biti posredovan receptorima (transcitoza posredovana receptorom) ili nezavisan od receptora (transcitoza fluidne faze) (Michel i Curry, 1999; Rippe i sar., 2002; Simionescu i sar., 2002). Prostorna heterogenost bazalne propustljivosti objašnjava se razlikama u svojstvima međućelijskih veza (pre svih, TJ i AJ), prisustvom ili odsustvom fenestri, i aktivnošću transcitozne mašinerije. Struktura i funkcija međućelijskih veza prilagođene su tipu krvnog suda i funkcionalnim potrebama organa. Broj i složenost TJ obrnuto su srazmerni propustljivosti. S tim u vezi, primećeno je da endotel arterija i krvno-moždana barijera (engl. *blood-brain barrier*, BBB) imaju visoko razvijene TJ i nisku propustljivost, dok su u postkapilarnim venulama, gde je neophodna veća dinamika u prolasku ćelija, ove veze manje zastupljene (Bazzoni i Dejana, 2004; Cerutti i Ridley, 2017; Cong i Kong, 2020). Miševi kod kojih je manipulacijom uklonjen gen koji kodira klaudin-5 (tzv. klaudin-5 *knockout* miševi) imaju selektivno narušenu funkciju BBB (Nitta i sar., 2003), dok upotreba anti-VE-kadherin antitela *in vivo* povećava vaskularnu propustljivost prvenstveno u plućima i srcu, što potvrđuje ulogu AJ u specifičnoj propustljivosti endotela u određenim delovima tela (Corada i sar., 1999). Prisustvo fenestri u kontinuiranom endotelu povezano je sa povećanom propustljivošću za tečnosti i male rastvore, ali ne i za makromolekule (Levick i Smaje, 1987).

Glikokaliks na površini endotela predstavlja dodatnu, dinamičnu komponentu barijere: utiče na hidrauličku provodljivost, raspodelu strujanja i filtraciju, učestvuje u mehanosenzaciji smičućeg napona (engl. *shear stress*) i moduliše interakcije sa proteinima plazme. Očuvana struktura glikokaliksa doprinosi niskoj bazalnoj propustljivosti, dok njegov gubitak (o čemu će biti reči u narednim pasusima) povećava prolaz tečnosti i rastvorenih supstanci. Drugim rečima, integritet glikokaliksa, zajedno sa TJ/AJ i

kontrolisanom transcitozom, čini trostruku osnovu fiziološke endotelne barijere (Reitsma i sar., 2007).

U patofiziološkim stanjima, endotelna barijera gubi fino podešenu ravnotežu između paracelularnog i transcelularnog transporta. Upalni medijatori (histamin, serotonin, bradikinin, trombin, faktor nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF-α) i faktori kao što je vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) remete međućelijske veze preko fosforilacije i internalizacije VE-kadherina u AJ i promena u kompleksu TJ (npr. klaudin-5), što vodi retrakciji endotelnih ćelija i nastanku međućelijskih procepa, odnosno porastu paracelularne propustljivosti. Rezultat je akumulacija tečnosti i proteina u intersticijumu, edem i disfunkcija tkiva (Komarova i Malik, 2010). Povećana transcelularna propustljivost takođe doprinosi „curenju" vaskularne barijere. VEGF, u literaturi opisan i kao „faktor vaskularne propustljivosti", pojačava transcitozu makromolekula preko kaveola i VVO i može da formira transendotelne kanale, čime se, nezavisno od međućelijskih veza, omogućava prolazak proteina plazme. Ovaj mehanizam je karakterističan za tumorsku mikrovaskulaturu i mikrovaskulaturu izmenjenu usled upalnih procesa, a u vezi je sa hiperpermeabilnošću i edemom tkiva (Dvorak, 2002). Preovlađujuće mesto ovih promena su postkapilarne venule, s obzirom da se odlikuju relativnim bogatstvom VVO, oskudnijim TJ, što za posledicu ima slabije međućelijske kontakte, i visokom ekspresijom H_2 histaminskih, serotoninskih i bradikininskih receptora. Nije, međutim, poznato da li sve postkapilarne venule u telu poseduju ove osobine. Teška inflamacija može narušiti barijernu funkciju i u drugim delovima vaskularnog sistema. Tako, na primer, TNF-α povećava propustljivost donje šuplje vene, ali ne i aorte, uz pojavu međućelijskih procepa (Eriksson i sar., 2005). U modelu dijabetesa kod pacova paracelularna propustljivost prvo raste u arteriolama i venulama, a potom u kapilarama (Barber i Antonetti, 2003). VEGF dovodi do stvaranja međućelijskih procepa i fenestri u postkapilarnim venulama i kapilarama (Roberts i Palade, 1995). Ovi nalazi zajedno ukazuju da je endotelna propustljivost fino regulisana strukturnim svojstvima međućelijskih veza, ulogom kaveola/VVO i lokalnom ekspresijom receptora, te da se u inflamaciji dominantno preusmerava ka delovima vaskularnog sistema sa slabijim međućelijskim vezama.

Kao i u bazalnim uslovima, kritičan element barijere u patofiziološkim uslovima je i endotelni glikokaliks. Njegovo „ljušćenje" (engl. *shedding*) pri sepsi, teškim infekcijama i drugim patološkim stanjima povezano je sa ranom disfunkcijom vaskularne barijere, povećanom propustljivošću i oštećenjem organa. Biomarkeri degradacije glikokaliksa (npr.

sindekan-1) se povećano eksprimiraju u teškim stanjima i u direktnoj su korelaciji sa težinom bolesti (Wu i sar., 2017).

Kliničke implikacije patološke propustljivosti su široke: od sindroma akutnog respiratornog distresa i sepse do moždanog edema, dijabetičnih mikrovaskularnih komplikacija i progresije tumora (Rosenberger i sar., 2023; Zhuo i sar., 2024). U onkologiji je poznato da hronično hiperpermeabilni i strukturno abnormalni tumorski krvni sudovi stvaraju efekat pojačane propustljivosti i zadržavanja, tzv. EPR efekat (engl. *enhanced permeability and retention*), koji omogućava nakupljanje makromolekulskih lekova i nano-nosača u tumorskom tkivu, međutim, ovaj efekat izrazito varira među pacijentima i tumorima (Maeda i sar., 2013; Wu, 2021).

Ukupno posmatrano, patološka propustljivost endotela proizlazi iz kombinacije povećanog raskidanja međućelijskih veza, pojačane transcitoze i/ili degradacije glikokaliksa, sa neposrednim posledicama u vidu edema, hipovolemije, hipoksije i oštećenja organa. Istovremeno, u specifičnim okruženjima kao što su tumori, ista pojava može biti iskorišćena za ciljanu terapiju.

2.1.2. Vezivanje i promet leukocita kroz vaskularni endotel

Endotel ima ključnu ulogu u regulaciji vezivanja i prometa leukocita kroz višestepeni proces poznat kao kaskada vezivanja leukocita, koja obuhvata početno hvatanje i kotrljanje leukocita po površini endotela, aktivaciju integrina signalima poreklom od hemokina, čvrstu adheziju, intravaskularno puzanje do mesta izlaska i, na kraju, transendotelnu migraciju (dijapedezu; TEM). Ovaj proces je prostorno i vremenski precizno koordinisan i u najvećoj meri se odvija u postkapilarnim venulama (Ley i sar., 2007; Muller, 2011).

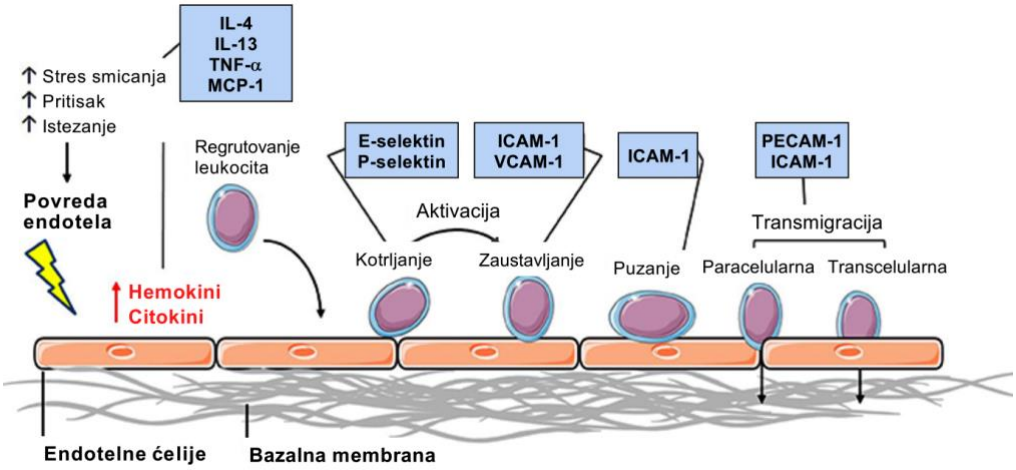
U fiziološkim uslovima, leukociti stalno kruže kroz organizam i patroliraju. U pitanju je proces koji se naziva imunološki nadzor (engl. *immunosurveillance*). Njihov zadatak je da rano prepoznaju patogene, oštećene ili maligno transformisane ćelije, a da pri tom očuvaju toleranciju prema sopstvenim tkivima. Efikasan imunološki nadzor zahteva usmerenu migraciju limfocita ka sekundarnim limfoidnim organima, naročito limfnim čvorovima. Ovaj proces, poznat kao usmeravanje (engl. *homing*), zasniva se na prepoznavanju adresina na visokim endotelnim venulama limfnih čvorova posredstvom L-selektina, čime se omogućava početno vezivanje i kotrljanje limfocita, a potom njihov ulazak u limfno tkivo (Berg i sar., 1991; Rosen, 1999). Na taj način se obezbeđuje neprekidno kruženje naivnih i

memorijskih limfocita kroz sekundarne limfoidne organe bez narušavanja integriteta vaskularne barijere.

U patofiziološkim stanjima, naročito tokom inflamacije, endotelne ćelije se aktiviraju i menjaju svoj fenotip kako bi omogućile ciljano regrutovanje leukocita ka mestima oštećenja ili infekcije. Aktivacija endotela podrazumeva povećanu ekspresiju ćelijskih adhezivnih molekula (engl. *cell adhesion molecules*, CAM), uključujući selektine, međućelijski adhezivni molekul 1 (engl. *intracellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) i molekul adhezije vaskularnih ćelija 1 (engl. *vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1), kao i pojačano lučenje proinflamacijskih citokina i hemokina (Nourshargh i Alon, 2014; Aguilar i sar., 2020). CAM-ovi učestvuju u različitim fazama migracije leukocita iz krvotoka ka mestima infekcije. Promene u rigidnosti tkiva, turbulentan tok krvi, prisustvo proinflamacijskih hemokina i citokina i mnogi drugi stimulusi iz krvi takođe mogu da dovedu do povećane ekspresije ovih molekula na površini endotelnih ćelija (Cerutti i Ridley, 2017). Proinflamacijski faktori poput citokina, posebno TNF-α, i hemokina takođe indukuju sporu aktivaciju endotela koja traje nekoliko časova. Ovo predstavlja patofiziološki odgovor endotela, pri čemu se aktiviraju plejotropni transkripcioni faktori koji pokreću ekspresiju gena koji kodiraju razne patofiziološke efektorne proteine kao što su VCAM-1, ICAM-1 i E-selektin (Gimbrone i Garcia-Cardeña, 2016). Pored toga, reaktivne vrste kiseonika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) se sve više nakupljaju u endotelnim ćelijama, što dodatno pospešuje hemoatrakciju i vezivanje putem aktiviranja proteina hemoatraktanta za monocite 1 (engl. *monocyte chemoattractant protein 1*, MCP-1), ICAM-1 i VCAM-1 (Endemann i Schiffrin, 2004; Nourshargh i Alon, 2014). Navedeni proteini zajedno indukuju lokalni proinflamacijski fenotip endotela. Pored adhezivnih molekula i proinflamacijskih faktora, važnu ulogu u regulaciji ovog procesa imaju i proteini ECM-a, uključujući fibronektin i kolagen, koji dodatno usmeravaju migraciju i aktivaciju leukocita (Golias i sar., 2007; Nourshargh i Alon, 2014).

Leukociti se zatim vezuju za aktivirani endotel posredstvom selektina, koji omogućavaju kotrljanje, dok hemokini prezentovani na površini endotela aktiviraju integrine leukocita i omogućavaju njihovu čvrstu adheziju za endotel. Nakon zaustavljanja, leukociti intravaskularno puze do pogodnih mesta za izlazak, gde dolazi do TEM-a u subendotelni prostor. Leukociti mogu prolaziti kroz endotel paracelularnim putem, između susednih endotelnih ćelija, ili transcelularnim putem, kroz telo endotelne ćelije (slika 2.4). Ovi procesi uključuju privremeno remodelovanje međućelijskih veza endotela i koordinisanu

signalizaciju između leukocita i endotelnih ćelija (Cerutti i Ridley, 2017). TEM predstavlja precizno regulisan i koordinisan proces neophodan za održavanje homeostaze organizma, a disfunkcija ovog procesa povezana je sa brojnim patološkim stanjima uključujući hronične upale, autoimunske poremećaje i imunosupresivne promene u organizmu.



Slika 2.4. Šematski prikaz kaskade vezivanja, kotrljanja, adhezije i transendotelne migracije leukocita, kao i molekula ćelijske adhezije uključenih u ove procese. Kaskada započinje povredom/aktivacijom endotela, što dalje pojačava upalne signalne mehanizme oslobađanjem citokina i hemokina. Zatim se cirkulišući leukociti regrutuju na aktivirani endotel, gde se čvrsto vezuju preko različitih klasa adhezivnih molekula. Nakon toga, leukociti se kotrljaju duž endotela, zaustavljaju, a zatim pužu, nakon čega mogu transmigrirati kroz zid krvnog suda na jedan od dva načina: paracelularno ili transcelularno. ICAM-1 – međućelijski adhezivni molekul 1; IL-4 – interleukin 4; IL-13 – interleukin 13; MCP-1 – protein hemoatraktant za monocite 1; PECAM-1 – molekul endotelnih ćelija koji vezuje trombocite 1; TNF-α – faktor nekroze tumora alfa; VCAM-1 – molekul adhezije vaskularnih ćelija 1. Preuzeto uz modifikacije iz Shihata i saradnici (2016).

Disfunkcija regulacije prometa leukocita predstavlja važan patofiziološki mehanizam u razvoju hroničnih inflamacijskih i KVB. Posebno je značajna uloga VCAM-1 u selektivnom regrutovanju monocita i limfocita u vaskularni zid, što predstavlja jedan od ranih događaja u nastanku aterosklerotskih lezija. Ekspresija VCAM-1 je naročito izražena u regionima vaskularnog sistema podložnim razvoju ateroskleroze, što dodatno naglašava vezu između endotelne aktivacije, inflamacije i progresije bolesti (Gimbrone i García-Cardeña, 2016). Na taj način, regulacija vezivanja i prometa leukocita predstavlja ključnu funkciju endotela u očuvanju homeostaze, ali i centralni mehanizam uključen u patogenezu inflamacijskih i kardiovaskularnih oboljenja.

2.1.3. Uloga azot-monoksida u regulaciji vaskularne homeostaze

Furchgott i Zawadzki su još 1980. godine ukazali na postojanje tzv. „opuštajućeg faktora endotelnog porekla“ (engl. *endothelium-derived relaxing factor*, EDRF), koji ima ključnu ulogu u mehanizmu vazodilatacije krvnih sudova (Gimbrone i García-Cardeña, 2016), a za koji je kasnije pokazano da je NO (Palmer i sar., 1987). Od tada su se saznanja o značaju NO-a značajno proširila, te se danas zna da ovaj visoko reaktivan gas predstavlja jedan od ključnih signalnih molekula vaskularnog endotela koji ima centralnu ulogu u održavanju vaskularne homeostaze. U endotelnim ćelijama, NO se sintetiše iz L-arginina delovanjem endotelne NOS (eNOS), enzima čija je aktivnost strogo regulisana koncentracijom kalcijuma, interakcijom sa kalmodulinom, fosforilacijom i dostupnošću kofaktora, među kojima je posebno značajan tetrahidrobiopterin (BH_4) (Förstermann i Sessa, 2012). U fiziološkim uslovima, bazalna produkcija NO-a omogućava očuvanje normalne funkcije krvnih sudova i predstavlja jedan od osnovnih mehanizama zaštite vaskularnog zida.

Jedna od najvažnijih fizioloških uloga NO-a jeste regulacija vaskularnog tonusa. NO difunduje iz endotelnih ćelija u susedne glatke mišićne ćelije, gde aktivira rastvorljivu guanilat-ciklazu, što dovodi do povećanja koncentracije cikličnog guanozin-monofosfata (cGMP). cGMP potom aktivira protein kinazu G, što za posledicu ima smanjenje intracelularne koncentracije Ca^{2+} i relaksaciju glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova. Na ovaj način NO doprinosi održavanju adekvatnog protoka krvi i krvnog pritiska (Moncada i Higgs, 1993; Gimbrone i García-Cardeña, 2016). Pored vazodilatacijskog dejstva, NO ispoljava i antitrombotski efekat, s obzirom na to da inhibiše aktivaciju, agregaciju i adheziju trombocita, čime se sprečava formiranje tromba. Ovaj efekat dodatno je pojačan delovanjem prostaciklina, koji sinergistički inhibiše aktivaciju trombocita (Förstermann i Sessa, 2012).

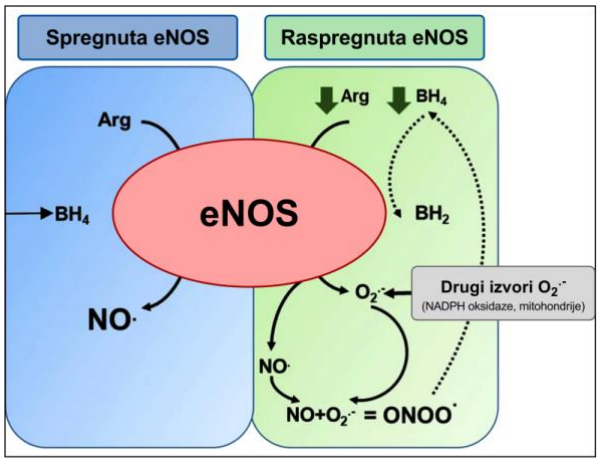
Azot-monoksid takođe ispoljava antiinflamacijska svojstva, jer smanjuje ekspresiju hemokina MCP-1, kao i CAM-ova, čime se ograničava regrutovanje leukocita ka vaskularnom zidu i njihova adhezija za endotel (Radomski i sar., 1987; Kubes i sar., 1991). Pored toga, NO ostvaruje interakciju sa hemoglobinom u eritrocitima, što može doprineti finom podešavanju isporuke kiseonika u mikrocirkulaciji (Gimbrone i García-Cardeña, 2016; Cyr i sar., 2020). Protektivnu ulogu NO dodatno potvrđuje i njegova sposobnost da spreči apoptozu endotelnih ćelija indukovanu delovanjem ROS-a, proinflamacijskih citokina i angiotenzina II (Förstermann i Sessa, 2012).

NO ima i značajnu ulogu u regulaciji proliferacije i migracije glatkih mišićnih ćelija, čime doprinosi stabilnosti vaskularnog zida i sprečava patološko remodelovanje krvnih sudova. Pored toga, NO učestvuje u finoj regulaciji vaskularne permeabilnosti i angiogeneze, delujući u interakciji sa drugim signalnim molekulima, uključujući VEGF (Papapetropoulos i sar., 1997; Dulak i Józkowicz, 2003). Na taj način, NO predstavlja integrativni regulator više ključnih funkcija endotela u fiziološkim uslovima.

U patofiziološkim stanjima dolazi do poremećaja sinteze i bioraspoloživosti NO-a, što predstavlja jedno od osnovnih obeležja endotelne disfunkcije. Smanjeno stvaranje NO-a ili njegovo pojačano uklanjanje usled reakcije sa ROS-om dovodi do stvaranja peroksinitrita ($ONOO^-$) i gubitka zaštitnih efekata NO-a (Förstermann, 2010). Ovi procesi su naročito izraženi u uslovima hronične inflamacije, oksidativnog stresa, hiperlipidemije, dijabetesa i hipertenzije, koji su ujedno i glavni faktori rizika za razvoj ateroskleroze (Gimbrone i García-Cardeña, 2016). Glavni izvori ROS-a u endotelnim ćelijama uključuju enzime NADPH oksidaze i ksantin oksidazu, kao i respiratorni lanac u mitohondrijama. Dodatno, poremećaji u funkciji eNOS-a, koji se manifestuju kao rasprezanje eNOS-a (engl. *eNOS uncoupling*), predstavljaju važan mehanizam smanjene bioraspoloživosti NO-a i pojačanog stvaranja ROS-a (Incalza i sar., 2018). U uslovima rasprezanja eNOS-a, najčešće usled nedostatka BH_4, enzim gubi sposobnost efikasne oksidacije L-arginina i funkcionalno se ponaša kao izvor superoksid anjon-radikala ($O_2^{\bullet -}$). Superoksid reaguje sa NO-om i formira $ONOO^-$, koji dovodi do nitracije proteina i dodatnog oštećenja endotelnih ćelija. $ONOO^-$ takođe oksiduje BH_4 u njegovu biološki neaktivnu formu 7,8-dihidrobiopterin (BH_2), čime se dodatno pogoršava rasprezanje eNOS-a i pojačava oksidativni stres (slika 2.5). Pored toga, $ONOO^-$ učestvuje i u oksidaciji lipoproteina male gustine (engl. *low-density lipoproteins*, LDL), čime direktno doprinosi razvoju ateroskleroze (Endemann i Schiffrin, 2004; Cyr i sar., 2020).

Ukupno posmatrano, smanjena bioraspoloživost NO-a doprinosi povećanoj vaskularnoj kontraktilnosti, pojačanoj adheziji leukocita, aktivaciji trombocita i proliferaciji glatkih mišićnih ćelija, čime se stvaraju uslovi za nastanak i progresiju aterosklerotskih lezija. Istovremeno, poremećena signalizacija preko NO-a utiče na patološku angiogenezu i destabilizaciju aterosklerotskog plaka, što dodatno povećava rizik od trombotskih komplikacija, poput infarkta miokarda i moždanog udara (Sessa, 2004; Michel i Vanhoutte, 2010). Zbog toga se NO smatra jednim od ključnih molekulskih pokazatelja funkcionalnog

stanja endotela i centralnom vezom između fiziološke regulacije vaskularne homeostaze i patoloških procesa koji vode ka razvoju ateroskleroze i KVB.



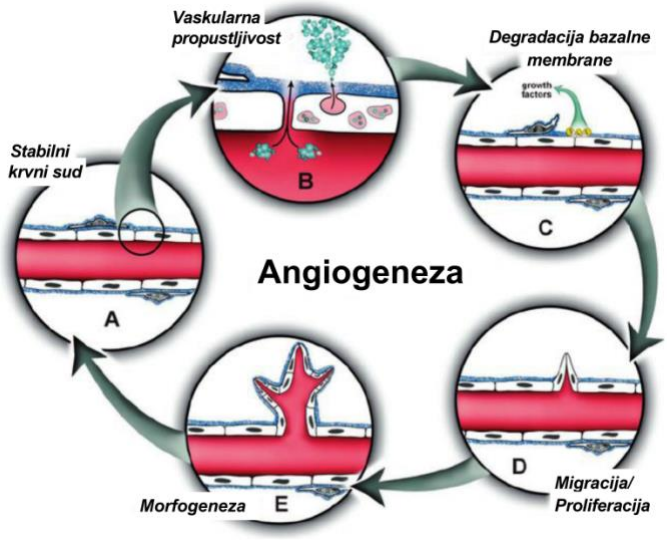
Slika 2.5. Spregnuto i raspregnuto stanje endotelne azot-monoksid sintaze. U uslovima dovoljne dostupnosti BH_4, eNOS je u spregnutom stanju i katalizuje sintezu NO (plavi panel). Kada je dostupnost BH_4 smanjena, dolazi do rasprezanja eNOS-a, pri čemu enzim, pored NO, proizvodi i $O_2^{\bullet-}$ (zeleni panel). Reakcijom NO i $O_2^{\bullet-}$ nastaje $ONOO^-$, koji dalje oksiduje BH_4 i dodatno pogoršava rasprezanje eNOS-a (isprekidana linija). NO može biti dodatno inaktivisan reakcijom sa $O_2^{\bullet-}$ koji potiče iz drugih izvora, kao što su NADPH oksidaze ili mitohondrije, čime se smanjuje njegova bioraspoloživost i doprinosi razvoju endotelne disfunkcije. BH_4 – tetrahidrobiopterin; BH_2 – 7,8-dihidrobiopterin; eNOS – endotelna azot-monoksid sintaza; NO – azot-monoksid; $O_2^{\bullet-}$ – superoksid anjon-radikal; $ONOO^-$ – peroksinitrit. Preuzeto uz modifikacije iz Edgar i saradnici (2023).

2.1.4. Angiogeneza kao adaptivna funkcija vaskularnog endotela

Neovaskularizacija, stvaranje novih krvnih sudova, može se odvijati putem lokalne proliferacije i migracije endotelnih ćelija, ali i mobilizacijom prekursora, odnosno progenitorskih endotelnih ćelija iz koštane srži. U okviru neovaskularizacije razlikuju se tri osnovna procesa: vaskulogeneza, angiogeneza i arteriogeneza.

Angiogeneza predstavlja ključni mehanizam neophodan za čitav niz fizioloških i patofizioloških procesa. Može se odvijati pupljenjem (engl. *sprouting*) ili unutrašnjom deobom postojećih krvnih sudova (engl. *intussusception*), nakon čega sledi transformacija vaskularne mreže kroz procese stabilizacije, očvršćavanja i remodelovanja (slika 2.6). Ovi procesi rezultuju formiranjem novih kapilara (lat. *de novo*) i povećanjem regionalnog

protoka krvi, koji može porasti i do 2–3 puta u odnosu na početne vrednosti (Felmeden i sar., 2003; Lamalice i sar., 2007).



Slika 2.6. Šematski prikaz angiogeneze. Tokom procesa angiogeneze, stabilni krvni sudovi (**A**) prolaze kroz povećanje vaskularne propustljivosti, čime se omogućava ekstravazacija proteina plazme (**B**). Degradacija ekstracelularnog matriksa posredovana matriksnim metaloproteinazama dovodi do prekida kontakata između pericita i endotelnih ćelija i oslobađanja faktora rasta vezanih za ekstracelularni matriks (**C**). Endotelne ćelije zatim proliferišu i migriraju ka svom konačnom odredištu (**D**), gde se organizuju u cevaste strukture sa lumenom (**E**). Preuzeto uz modifikacije iz Bryan i D'Amore (2007).

U fiziološkim uslovima, angiogeneza predstavlja strogo regulisan proces formiranja novih krvnih sudova iz postojećeg vaskularnog stabla i ima ključnu ulogu u razvoju, rastu i održavanju tkivne homeostaze (Carmeliet, 2005). Normalno se odvija tokom embrionalnog razvoja, menstrualnog ciklusa kod žena i formiranja posteljice nakon oplodnje, kao i tokom zarastanja rana, oporavka nakon ishemije, regeneracije koštanog tkiva i rasta dlake (Carmeliet, 2003; Stegen i sar., 2015). U ovim kontekstima, angiogeneza je prostorno i vremenski kontrolisana, što omogućava formiranje funkcionalne, stabilne i hijerarhijski organizovane vaskularne mreže bez narušavanja vaskularne homeostaze (Potente i sar., 2011).

Centralni regulator fiziološke angiogeneze je ravnoteža između proangiogenih i antiangiogenih signala (Carmeliet, 2005). Među proangiogenim faktorima posebno mesto zauzima VEGF, koji stimuliše proliferaciju, migraciju i preživljavanje endotelnih ćelija, kao i povećanje vaskularne propustljivosti, čime započinje formiranje novih krvnih sudova

(Ferrara, 2004; Lee i sar., 2021). VEGF deluje pretežno preko receptora VEGFR-2 na površini endotelnih ćelija, aktivirajući signalne puteve uključene u reorganizaciju citoskeleta i migraciju ćelija (Risau, 1997; Ferrara, 2004). U ovom procesu ključnu ulogu imaju integrini, αβ heterodimerni receptori, koji ostvaruju kontakt sa proteinima ECM-a kao što su fibronektin, laminin i kolagen. Ova interakcija je značajna za formiranje kapilarnih pupoljaka i razvoj vaskularnih struktura (Reinhart-King, 2008). Pored hemijskih signala, i mehaničke osobine matriksa imaju značajan uticaj na migraciju i organizaciju endotelnih ćelija u cevaste strukture, što dodatno potvrđuje složenost i multifaktorsku prirodu procesa angiogeneze. Pored VEGF, značajnu ulogu u nastanku novih krvnih sudova imaju i faktor rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor*, FGF), TNF-α, transformišući faktor rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*, TGF-β), insulinu sličan faktor rasta 1 (engl. *insulin-like growth factor 1*, IGF-1), estrogeni, prostaglandini, angiopoetini (Ang-1 i Ang-2), kao i faktori vezani za hipoksiju, naročito faktor indukovan hipoksijom 1 alfa (engl. *hypoxia-inducible factor 1 alpha*, HIF-1α), koji omogućava prilagođavanje angiogenog odgovora metaboličkim potrebama tkiva (Adams i Alitalo, 2007; Potente i sar., 2011). Nasuprot navedenim proangiogenim faktorima, u inhibitore angiogeneze spadaju angiostatin, endostatin, trombospondin-1, tkivni inhibitori metaloproteinaza, interleukini, interferoni, prostaglandini i mnogi drugi (Felmeden i sar., 2003; Tonini i sar., 2003; Lamalice i sar., 2007).

Fiziološka angiogeneza ne podrazumeva samo inicijalno formiranje novih kapilara, već i njihovu maturaciju i stabilizaciju, procese u kojima učestvuju periciti, glatke mišićne ćelije i ECM. Interakcija endotela sa potpornim ćelijama, uz aktivnost signalnih puteva kao što su Ang-1/Tie-2 i TGF-β, obezbeđuje stabilnost novonastalih sudova, njihovu pravilnu funkciju i dugotrajnu integraciju u postojeću vaskularnu mrežu (Augustin i sar., 2009). Ovakva fino podešena regulacija razlikuje fiziološku angiogenezu od patoloških oblika, kod kojih dolazi do formiranja strukturno i funkcionalno abnormalnih krvnih sudova.

U patološkim uslovima, angiogeneza gubi strogu prostornu i vremensku kontrolu karakterističnu za fiziološke procese i poprima disfunkcionalna obeležja. Prekomerna ili nekontrolisana angiogeneza uočava se u brojnim patološkim stanjima, naročito tokom rasta, progresije i metastaziranja tumora (Hida i sar., 2018), gde je angiogeneza neophodna za uspostavljanje adekvatnog krvotoka, obezbeđivanje dotoka kiseonika i hranljivih materija, uklanjanje metaboličkih produkata i omogućavanje daljeg rasta i proliferacije tumorskog tkiva, te je jasno da ima ključnu ulogu u progresiji bolesti. Hipoksični uslovi u tumorskom

mikrookruženju dovode do stabilizacije i aktivacije HIF-1α, koji predstavlja centralni regulator adaptivnog odgovora ćelija na nedostatak kiseonika. Aktivirani HIF-1α indukuje ekspresiju brojnih proangiogenih faktora, među kojima je VEGF jedan od najznačajnijih, čime se pokreće i održava proces tumorske angiogeneze. Smatra se da povećano stvaranje ROS-a i prisustvo inflamacijskih medijatora dodatno pojačavaju aktivaciju signalnog puta HIF-1α/VEGF, doprinoseći neovaskularizaciji tumorskog tkiva i remodelovanju vaskularnog mikrookruženja (Felmeden i sar., 2003; Tonini i sar., 2003; Herrmann i sar., 2006). Povećana angiogeneza se javlja i u nemalignim bolestima i stanjima kao što su psorijaza, sistemski lupus, dijabetična retinopatija, reumatoidni artritis i ateroskleroza (Carmeliet, 2003; Felmeden i sar., 2003; Lee i sar., 2021), kao i tokom ekspanzije masnog tkiva i razvoja gojaznosti kod ljudi (Rutkowski i sar., 2009; Lemoine i sar., 2013). S druge strane, nedovoljno održavanje ili rast krvnih sudova može dovesti do razvoja hroničnih nezarastajućih ulkusa i atrezije creva, kao i ishemije, koja je karakteristična za oboljenja kao što su infarkt miokarda i moždani udar (Kotlinowski i Józkowicz, 2016). Za razliku od fiziološke angiogeneze, novonastali krvni sudovi u patološkim stanjima često su strukturno i funkcionalno nezreli, sa slabom pokrivenošću pericitima, diskontinuiranom bazalnom membranom i povećanom vaskularnom propustljivošću, što ih čini sklonim curenju i dodatnom oštećenju tkiva (Risau, 1997; Adams i Alitalo, 2007).

Jedna od centralnih karakteristika patološke angiogeneze u gore opisanim bolestima i stanjima je perzistentna aktivacija proangiogenih signalnih puteva, pre svega VEGF, koja je često uslovljena hroničnom hipoksijom i inflamacijom (Ferrara, 2004; Carmeliet i Jain, 2011). Produžena i nekontrolisana ekspresija VEGF dovodi do neorganizovanog grananja kapilara i formiranja vaskularne mreže sa poremećenim protokom krvi. Istovremeno, disbalans u signalizaciji angiopoetina, naročito povećana ekspresija Ang-2 uz relativni deficit Ang-1, destabilizuje postojeće krvne sudove i sprečava njihovu adekvatnu maturaciju (Augustin i sar., 2009). Inflamacijski citokini, kao što su TNF-α i IL-1β, dodatno pojačavaju angiogeni odgovor aktivacijom endotelnih ćelija i remodelovanjem ECM-a, čime se održava patološko angiogeno mikrookruženje (Carmeliet, 2005).

U kontekstu ateroskleroze, patološka angiogeneza ima značajnu ulogu u progresiji i destabilizaciji aterosklerotskih lezija. Pokazano je da u uznapredovalim aterosklerotskim plakovima dolazi do formiranja neovaskularizacije iz *vasa vasorum*, koja se širi ka unutrašnjosti plaka (Moulton, 2006). Međutim, angiogeneza može započeti i u ranim fazama aterosklerotskog procesa i perzistirati tokom daljeg rasta i remodelovanja plaka.

Neovaskularizacija povećava lokalni dotok kiseonika i hranljivih materija, čime doprinosi progresiji lezije, dok istovremeno hipoksični uslovi unutar plaka stimulišu oslobađanje faktora rasta i pojačavaju ekspresiju HIF-1α i VEGF, čime se dodatno održava angiogeni odgovor. Novonastali kapilari u aterosklerotskim plakovima često su krhki i nezreli, sa tankim zidovima i izraženom propustljivošću, što omogućava ekstravazaciju lipoproteina, eritrocita i inflamacijskih ćelija u unutrašnjost plaka (Sluimer i sar., 2009). Ovi procesi dovode do mikrokrvarenja unutar plaka, povećanja zapremine nekrotičnog jezgra i slabljenja fibrozne kape, čime se značajno povećava rizik od pucanja plaka i nastanka trombotskih komplikacija, uključujući infarkt miokarda i moždani udar (Virmani i sar., 2000; Michel i sar., 2012; Camaré i sar., 2017; Chen i sar., 2025). Pored hipoksije, sve veći broj dokaza ukazuje na značaj mehaničkih faktora u regulaciji angiogeneze unutar aterosklerotskih lezija, među kojima se ističu sile smicanja i promenjeni hemodinamski uslovi. Ovi faktori deluju putem aktivacije mehanosenzitivnih receptora na endotelnim ćelijama i signalnih puteva povezanih sa angiogenezom, čime dodatno doprinose razvoju i destabilizaciji aterosklerotskog plaka (Chen i sar., 2025).

U skladu sa prethodno opisanim procesima, patološka angiogeneza u aterosklerozi usko je povezana sa endotelnom disfunkcijom, koja predstavlja kako inicijalni, tako i održavajući faktor bolesti (Gimbrone i García-Cardeña, 2016). Disfunkcionalni endotel karakteriše smanjena bioraspoloživost NO-a, povećana ekspresija CAM-ova i pojačano lučenje proinflamacijskih i proangiogenih medijatora. Ovi poremećaji ne samo da podstiču regrutovanje i zadržavanje inflamacijskih ćelija u vaskularnom zidu, već istovremeno stvaraju mikrookruženje koje pogoduje neadekvatnoj i disfunkcionalnoj angiogenoj aktivaciji unutar aterosklerotskog plaka. Na taj način se uspostavlja začarani krug, u kome endotelna disfunkcija i patološka angiogeneza međusobno pojačavaju progresiju ateroskleroze, čime direktno doprinose razvoju KVB.

2.2. Uticaj faktora iz spoljašnje sredine na nastanak i razvoj kardiovaskularnih bolesti

Kardiovaskularne bolesti predstavljaju vodeći uzrok smrtnosti u svetu. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO), od KVB je 2022. godine umrlo približno 19,8 miliona ljudi, što čini oko 32% svih smrtnih ishoda na globalnom nivou, pri čemu se 85% odnosi na infarkt miokarda i moždani udar

(WHO, 2023). Iako genetska predispozicija, faktori načina života (pušenje, ishrana, fizička neaktivnost), kao i opšte zdravstveno stanje organizma, uključujući prisustvo hipertenzije, dijabetesa, gojaznosti i sl. imaju značajnu ulogu u razvoju KVB, savremeni epidemiološki trendovi ukazuju na rastući značaj faktora iz spoljašnje sredine. Tokom poslednjih godina identifikovana su četiri ključna faktora koji značajno doprinose razvoju i progresiji KVB: zagađenje vode, vazduha i zemljišta, buka iz okoline, svetlosno zagađenje i klimatske promene.

Zagađenje vazduha odgovorno je za više od 6,5 miliona smrtnih slučajeva godišnje širom sveta, pri čemu je ovaj broj u porastu (Fuller i sar., 2022). Zagađenje vazduha, uključujući fine suspendovane čestice ($PM_{2.5}$), azotne okside i ozon, danas se smatra jednim od najznačajnijih ekoloških faktora rizika za nastanak i razvoj KVB. Epidemiološke i eksperimentalne studije su pokazale da akutna i hronična izloženost aerozagađenju povećava rizik od infarkta miokarda, moždanog udara, srčane insuficijencije i aritmija (Cosselman i sar., 2015; Bhatnagar, 2017). Štaviše, procene ukazuju da se približno 80% smrtnih ishoda povezanih sa zagađenjem spoljašnjeg vazduha može pripisati ishemijskoj bolesti srca i moždanom udaru, čime se jasno naglašava izuzetna osetljivost KVS-a na aerozagađenje (WHO, 2016; Rajagopalan i sar., 2018). Mehanizmi uključuju sistemsku inflamaciju, oksidativni stres, endotelnu disfunkciju i poremećaje autonomne regulacije, što naglašava centralnu ulogu vaskularne barijere u odgovoru na ekološke stresore.

Pored zagađenja vazduha, buka iz životne sredine, naročito saobraćajna buka, prepoznata je kao nezavisan faktor rizika za KVB. Epidemiološke studije su pokazale da se sa svakim povećanjem nivoa buke za 10 decibela rizik od razvoja ishemijske bolesti srca povećava za približno 8%. Prema procenama WHO, u Zapadnoj Evropi se godišnje izgubi najmanje 1,6 miliona godina zdravog života (engl. *healthy life-years*) kao posledica izloženosti buci povezanoj sa saobraćajem (Münzel i sar., 2021). Noćna izloženost saobraćajnoj buci dovodi do fragmentacije i skraćenja sna, povećanja nivoa hormona stresa, kao i do porasta oksidativnog stresa u vaskularnom sistemu i mozgu. Ovi patofiziološki procesi mogu doprineti razvoju endotelne disfunkcije, inflamacije i hipertenzije, čime se značajno povećava rizik od nastanka i progresije KVB (Vienneau i sar., 2015; Münzel i sar., 2018).

Svetlosno zagađenje, posebno izloženost veštačkom svetlu tokom noći, dovodi do poremećaja cirkadijalnog ritma i inhibicije lučenja melatonina, hormona koji ima značajnu antioksidativnu i kardioprotektivnu ulogu. Narušavanje cirkadijalne regulacije povezano je

sa povećanim rizikom od hipertenzije, metaboličkog sindroma i kardiovaskularnih događaja, čime svetlosno zagađenje predstavlja nov, ali sve relevantniji faktor rizika za KVB (Obayashi i sar., 2013; Sun i sar., 2021; Windred i sar., 2025).

Klimatske promene dodatno komplikuju ovaj odnos. Ekstremne temperature, kako visoke, tako i niske, povezane su sa povećanom kardiovaskularnom smrtnošću. Toplotni talasi povećavaju opterećenje KVS-a, dok hladnoća podstiče vazokonstrikciju i porast krvnog pritiska. Pored toga, porast globalne temperature povećava učestalost i intenzitet šumskih požara, čime se indirektno pogoršava kvalitet vazduha i dodatno povećava kardiovaskularni rizik (Gasparrini i sar., 2015; Fuller i sar., 2022).

Pored svih gore navedenih faktora, sve veći broj studija ukazuje da izloženost hemikalijama iz radnog i životnog okruženja koje se nalaze u vodi, hrani, kućnim proizvodima i industrijskim procesima predstavlja nezavisan faktor rizika za nastanak i progresiju KVB (Lechner i sar., 2020; Arredondo Eve i sar., 2024). Danas je u upotrebi više desetina hiljada sintetičkih hemikalija, od kojih se mnoge proizvode u velikim količinama i imaju potencijal da dospeju u ljudski organizam putem različitih puteva izloženosti. Posledično, zagađenje vazduha, vode i zemljišta ima značajan uticaj na zdravlje ljudi, pri čemu se smatra da globalno zagađenje doprinosi sa oko sedam miliona prevremenih smrti godišnje (Bhatnagar, 2017).

S obzirom na to da se nalazi u direktnom kontaktu sa cirkulišućom krvlju, vaskularni endotel predstavlja primarnu metu sistemskih toksičnih agenasa, uključujući brojne hemikalije poreklom iz radnog i životnog okruženja. Hronična izloženost takvim supstancama može dovesti do suptilnih, ali dugotrajnih promena u endotelnoj funkciji, koje vremenom doprinose razvoju ateroskleroze i njenih kliničkih komplikacija. U tom kontekstu, posebnu pažnju naučne i stručne javnosti privlače PFAS zbog njihove izuzetne perzistentnosti, bioakumulacije i dugog poluživota u ljudskom organizmu. Brojne epidemiološke studije pokazale su povezanost izloženosti PFAS sa poremećajima lipidnog profila, uključujući porast ukupnog i LDL-holesterola, čak i pri relativno niskim nivoima izloženosti (Nelson i sar., 2010; Averina i sar., 2021). Pored dislipidemije, sve je više dokaza o povezanosti PFAS sa povišenim krvnim pritiskom i povećanim rizikom od hipertenzije i metaboličkog sindroma, kako u opštoj populaciji, tako i u specifičnim kohortama izloženim kontaminiranoj vodi za piće (Huang i sar., 2018; Zare Jeddi i sar., 2021). Rezultati studije Batzella i saradnika (2022), sprovedene na penzionisanim radnicima fabrike u kojoj su se tokom više decenija proizvodile PFAS i druge hemikalije, ukazuju na jasnu povezanost

između serumskih nivoa PFAS i markera kardiovaskularnog rizika, te dodatno naglašavaju potrebu za kliničkim praćenjem kardiovaskularnih parametara kod populacija sa visokim stepenom izloženosti PFAS, naročito u profesionalnom okruženju. Mehanističke studije dodatno potkrepljuju ove nalaze, ukazujući da PFAS direktno deluju na endotelne ćelije krvnih sudova. Studije sprovedene u uslovima *in vitro* su pokazale da izlaganje endotelnih ćelija čoveka PFAS dovodi do povećanog stvaranja ROS-a, poremećaja u organizaciji citoskeleta, povećane propustljivosti endotela i smanjene bioraspoloživosti NO-a (Qian i sar., 2010; Porfirio i sar., 2024). U *in vivo* modelima, hronična izloženost PFAS ubrzava razvoj aterosklerotskih lezija i indukuje proinflamacijske fenotipske promene u vaskularnom zidu, što dodatno potvrđuje ulogu endotela kao ključne mete kardiovaskularne toksičnosti PFAS. Zajedno, ovi nalazi ukazuju da endotelna disfunkcija predstavlja centralnu kariku koja povezuje izloženost PFAS sa razvojem KVB.

Dostupni epidemiološki, eksperimentalni i mehanistički dokazi jasno ukazuju da hemikalije iz radnog i životnog okruženja, uključujući PFAS, imaju značajan potencijal da doprinesu razvoju KVB. Njihovo delovanje se ostvaruje kroz složene interakcije sa endotelom, koje vremenom dovode do poremećaja vaskularne homeostaze i ubrzanja aterosklerotskih procesa. Razumevanje ovih mehanizama je od suštinskog značaja za unapređenje procene rizika, razvoj preventivnih strategija i formulisanje regulatornih politika, što predstavlja jedan od ključnih ciljeva savremenih istraživanja u oblasti toksikologije i kardiovaskularne medicine, kao i fokus ove doktorske disertacije.

2.3. Per- i polifluoroalkilne supstance

Per- i polifluoroalkilne supstance predstavljaju grupu veštačkih organskih jedinjenja čija proizvodnja datira od 1940-ih godina. Sastoje se od hidrofobne, ugljenik-fluor (C–F) okosnice različite dužine (4–14 atoma ugljenika) i polarne funkcionalne grupe. Perfluoroalkilne supstance predstavljaju potpuno fluorisana alifatična jedinjenja u kojima su svi atomi vodonika vezani za ugljenik zamenjeni fluorom. S druge strane, polifluoroalkilne supstance imaju fluor supstituisan na najmanje jednom, ali ne na svim ugljenikovim atomima. Veza između ugljenika i fluora spada u najjače veze u organskoj hemiji – energija veze iznosi 485 kJ/mol (Qian i sar., 2010; Espartero i sar., 2022). Prema podacima Agencije za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Američkih Država (engl. *United States Environmental*

Protection Agency, U.S. EPA) procenjuje se da postoji preko 10 000 identifikovanih PFAS jedinjenja.

Per- i polifluoroalkilne supstance spadaju u grupu amfipatskih jedinja koja odlikuju izraženi hidrofilni i hidrofobni regioni. Zahvaljujući specifičnim fizičko-hemijskim osobinama, pre svega dugom per-/polifluoroalkilnom lanacu i jakim hemijskim vezama između atoma ugljenika i fluora, PFAS su otporne na termičku, hemijsku, fotolitičku i biološku degradaciju. Ova svojstva omogućila su njihovu široku primenu u različitim granama industrije i proizvodnji komercijalnih proizvoda različite namene (Xu i sar., 2018; Mokra, 2021). PFAS su prisutne u velikom broju svakodnevnih proizvoda široke namene (slika 2.7) kao što su posuđe, ambalaža za hranu i piće, tepisi, teflon, konac za zube, aparati za gašenje požara, kao i brojnim kozmetičkim i odevnim predmetima, obući i nameštaju (Lindstrom i sar., 2011; Wang i sar., 2017).

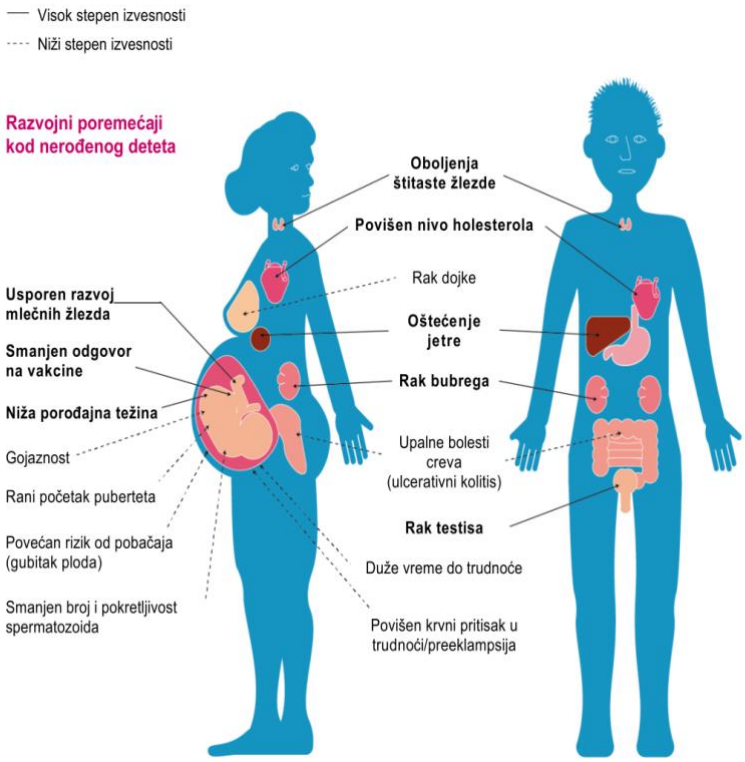


Slika 2.7. Proizvodi koji sadrže per- i polifluoroalkilne supstance. Preuzeto uz modifikacije sa https://kingcounty.gov/en/dept/dnrp/waste-services/hazardous-waste-program/news-events/news/2024-12-12-pfas-explained

Pored toga, PFAS imaju primenu u elektronskoj, automobilskoj i avioindustriji, kao i u izradi pena za gašenje požara (Buck i sar., 2011; Glüge i sar., 2020). Upravo zbog svoje stabilnosti, većina PFAS se veoma sporo ili uopšte ne razgrađuju u spoljašnjoj sredini i organizmu čoveka, te su poznate pod nazivom "večne hemikalije" (Cousins i sar., 2020).

Usled intenzivne i dugotrajne upotrebe, PFAS su danas široko rasprostranjene u životnoj sredini (Espartero i sar., 2022). Kao snažan antropogeni zagađivač, pronađene su i u mnogim površinskim i otpadnim vodama, zemljištu i ljudskoj krvi (Huang i sar., 2018). S

obzirom da ometaju normalno funkcionisanje endokrinog sistema kroz negativan uticaj na metabolizam, sintezu, sekreciju i eliminaciju endogenih hormona ili kroz narušavanje hormonske homeostaze u organizmu preko drugih mehanizama, PFAS su svrstane u grupu endokrinih ometača (Kabir i sar., 2015). U tom kontekstu, toksikološki profili koje je u maju 2021. objavila Agencija za toksične supstance i registar bolesti Sjedinjenih Američkih Država (engl. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry,* ATSDR) ukazuju da izloženost PFAS može dovesti do većeg broja štetnih efekata na zdravlje ljudi, koji se najčešće ispoljavaju na nivou endokrinog, imunskog i reproduktivnog sistema (Rosato i sar., 2024). Usled svoje postojanosti, bioakumulativne i toksične prirode mnoga PFAS jedinjenja su uvrštena na listu Stokholmske konvencije o perzistentnim organskim zagađivačima (engl. *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*), dok su druga već uključena u međunarodne programe monitoringa (Espartero i sar., 2022; Porfirio i sar., 2024).



Slika 2.8. Uticaj per- i polifluoroalkilnih supstanci na zdravlje ljudi. Preuzeto uz modifikacije iz European Environment Agency – *Effects of exposure to PFAS on human health*, CC BY 2.5 DK.

Tokom poslednje decenije, brojne studije ukazale su na zabrinutost zbog štetnih efekata ovih supstanci na životnu sredinu i zdravlje ljudi (Coperchini i sar., 2024). Rezultati brojnih epidemioloških i *in vitro* studija ukazali su na pozitivnu korelaciju između izloženosti PFAS i pojave različitih patoloških stanja. Danas se sa najvećom prevalencom kod ljudi

izdvajaju poremećaji u radu štitaste žlezde, povišen krvni pritisak u trudnoći (preeklampsija), poremećaji u enzimima jetre, povećanje koncentracije lipida u serumu, smanjenje telesne težine pri rođenju, smanjen odgovor na vakcine, rak bubrega i testisa i drugi poremećaji (slika 2.8), dok su kod laboratorijskih životinja uočeni toksični efekti na funkciju jetre, imunski odgovor, reproduktivnu funkciju i pojavu kancera (Espartero i sar., 2022).

Kao glavni putevi izloženosti PFAS kod čoveka izdvajaju se oralni unos preko kontaminirane hrane i vode za piće, preko kože prilikom upotrebe komercijalnih i industrijskih proizvoda, ali i preko pluća, udisanjem kontaminirane prašine. Ljudi su izloženi PFAS i u mnogim profesionalnim okruženjima, naročito radnici u procesima proizvodnje. Dospevanjem u organizam, ove supstance se transportuju putem krvi vezane za albumin i LDL do jetre, bubrega, slezine i mozga, gde se vrši njihovo skladištenje. Pored albumina i lipoproteina, PFAS se manjim delom vezuju i za α i γ globulinske frakcije i transferin. Za razliku od drugih organskih zagađivača, ove supstance pokazuju veći afinitet za proteine, kao što su albumini seruma, dok je afinitet za lipide znatno manji. Zbog toga se ne nakupljaju u masnom tkivu, već se najvećim delom akumuliraju u krvi i organima, vezivanjem za proteinske komponente.

Brojne epidemiološke studije pokazale su da se jetra izdvaja kao mesto najveće bioakumulacije PFAS, iako su visoke koncentracije ovih supstanci izmerene u bubrezima, plućima, kostima i mozgu (Góralczyk i sar., 2015; Cao i sar., 2022). Iz organizma čoveka se izlučuju putem urina i fecesa. Bubrežni klirens nije samo pasivan proces, već obuhvata glomerularnu filtraciju, aktivnu tubularnu sekreciju i tubularnu reapsorpciju. Membranski transporteri organskih anjona (engl. *organic anion transporter*, OAT), kao što su OAT/OATP, OAT4 i transporter mokraćne kiseline URAT1, doprinose povratku PFAS iz lumena bubrežnih tubula nazad u cirkulaciju. Ovi mehanizmi, zajedno sa vezivanjem za serumski albumin, pomažu da se objasni dug poluživot ovih supstanci u serumu ljudi (Niu i sar., 2023). Poluvreme eliminacije, vreme potrebno da koncentracija PFAS u serumu ili plazmi opadne za polovinu početne koncentracije, od suštinskog je značaja za kvantifikaciju postojanosti PFAS u organizmu čoveka. Vrednosti poluvremena eliminacije ovih supstanci kod ljudi variraju i kreću se u rasponu od 2,7 godina, pa do čak 27 godina za pojedine PFAS. Procene poluvremena eliminacije u različitim studijama ukazuju na značajnu varijabilnost između populacija i uslova izlaganja (Rosato i sar., 2024). Uopšteno posmatrano, toksične supstance sa dugim poluvremenom eliminacije pokazuju veći potencijal za bioakumulaciju,

budući da ih karakterišu visoka stopa apsorpcije i niska stopa izlučivanja iz organizma (Liao i sar., 2012; Mokra, 2021; Rosato i sar., 2024).

Zbog svojih mutagenih, kancerogenih i toksičnih efekata PFAS su uvrštene na listu kandidata (engl. *The Candidate List of substances of very high concern*) u okviru regulative REACH (engl. *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) Evropske unije od 18. decembra 2006. godine, sa izmenama od 16. decembra 2008. godine (Uredba br. 1272/2008.), čime su prepoznate kao supstance visokog rizika. Evropski parlament je u oktobru 2019. godine doneo izmenu koja se odnosi na dozvoljenu koncentraciju PFAS u vodi za piće, propisavši graničnu vrednost od 0,5 μM za sva PFAS jedinjenja. Holandija, Nemačka, Norveška, Danska i Švedska su u januaru 2023. godine Evropskoj agenciji za hemikalije (engl. *European Chemicals Agency*, ECHA) podnele predlog za ograničavanje upotrebe velikog spektra PFAS u cilju smanjenja njihovog negativnog uticaja na životnu sredinu i zdravlje čoveka. Danas je većina PFAS uvrštena u listu Stokholmske konvencije o perzistentnim organskim zagađivačima (Qiu i sar., 2016; Espartero i sar., 2022; Coperchini i sar., 2024).

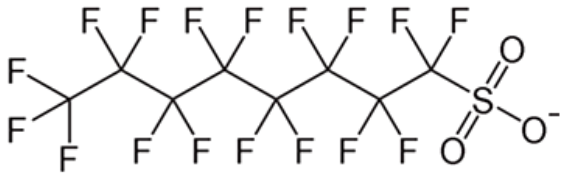
Brojne epidemiološke i *in vitro* studije ukazale su na toksične efekte PFAS na nivou nervnog, endokrinog i reproduktivnog sistema, dok su efekti ovih supstanci na drugim sistemima organa, uključujući KVS opisani u manjem broju studija (Cui i sar., 2022; Poston, 2019; Zeng i sar., 2019). Poznato je da većina ljudi u industralizovanim zemljama ima merljive koncentracije jedne ili više PFAS u krvi. U tom kontekstu, Danska je u julu 2020. godine usvojila zakonsku regulativu prema kojoj je upotreba ovih hemikalija zabranjena u papirnoj i kartonskoj ambalaži za hranu. Iako je stepen upotrebe ovih hemikalija u mnogim zemljama u padu, one i dalje predstavljaju veliki rizik za razvoj različitih oboljenja (Maranhao Neto i sar., 2022). S tim u vezi, kao posledica porasta smrtnosti usled KVB, sve veći broj populacionih studija usmeren je ka ispitivanju izloženosti PFAS kao mogućeg faktora rizika za nastanak KVB. Posebno se ispituje uticaj PFAS na homeostazu glukoze, metabolički sindrom, telesnu težinu i insulinsku rezistenciju.

2.3.1. Perfluorooktansulfonat

2.3.1.1. Osnovne karakteristike i upotreba perfluorooktansulfonata

Perfluorooktansulfonat (hemijski naziv po IUPAC-u: 1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-heptadekafluorookstansulfonska kiselina, CAS# 1763-23-1;

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Perfluorooctanesulfonate) predstavlja jedno od najznačajnijih jedinjenja iz grupe PFAS, čija primena datira od sredine XX veka. Strukturno, PFOS se sastoji od potpuno fluorisanog alkilnog lanca sa osam ugljenikovih atoma, pri čemu su svi atomi vodonika zamenjeni fluorom, i terminalne sulfonatne funkcionalne grupe (–SO_3H), koja mu daje specifična fizičko-hemijska i biološka svojstva (Buck i sar., 2011). Molekulska formula PFOS-a je $C_8HF_{17}O_3S$, a relativna molekulska masa iznosi 538,22 g/mol. Strukturna formula je prikazana na slici 2.9. U fiziološkim uslovima PFOS se javlja u anjonskom obliku, što značajno utiče na njegovu distribuciju u organizmu i interakciju sa proteinima plazme.



Slika 2.9. Strukturna formula perfluorooktansulfonata.

Hemijska struktura daje PFOS-u svojstva kao što su termička stabilnost, površinska aktivnost i sposobnost da „odbija" vodu i ulje, što ga čini korisnom komponentom u širokom spektru komercijalnih i industrijskih proizvoda kao što su ambalaža za hranu otporna na mast, nelepljivi premazi i fluoropolimeri, vodootporna i masnootporna odeća i obuća, sredstva za zaštitu tekstila i tepiha od mrlja, protivpožarne pene (AFFF), maziva, boje i lakovi, proizvodi za čišćenje i ličnu higijenu, poluprovodnici i fotografska oprema, kao i hidraulične tečnosti u avioindustriji (Buck i sar., 2011; OECD, 2018). Zbog veoma čvrstih veza između atoma ugljenika i fluora, PFOS se izuzetno sporo razgrađuje i transformiše, pa stoga pokazuje visoku ekološku postojanost i sklonost ka akumulaciji u biološkim sistemima (Lindstrom i sar., 2011). PFOS je detektovan u različitim ekosistemima širom sveta, uključujući i udaljene regione poput Arktika, što ukazuje na njegovu sposobnost transporta na velike udaljenosti (Muir i sar., 2019). Njegovo prisustvo potvrđeno je i u krvi ljudi i divljih životinja, što ukazuje na globalno rasprostranjenu izloženost.

Industrijska proizvodnja PFOS-a i njegovih prekursora dostigla je vrhunac krajem XX veka. Procene ukazuju da je oko 2000. godine globalna proizvodnja PFOS-a iznosila približno 3500 metričkih tona. Jedan od glavnih proizvođača, kompanija 3M, proizvela je između 1970. i 2002. godine oko 96 000 tona perfluorooktansulfonil-fluorida, ključnog intermedijera u sintezi PFOS-a (Miralles-Marco i Harrad, 2015). Pored direktne upotrebe

PFOS-a, značajan doprinos njegovoj prisutnosti u životnoj sredini potiče od velikog broja prekursorskih jedinjenja (više od 50), koja se u životnoj sredini i organizmu mogu transformisati u PFOS. Ova jedinjenja su korišćena u proizvodnji širokog spektra proizvoda, uključujući maziva, tekstilne premaze, kozmetiku i industrijske surfaktante (Mokra, 2021). Nakon postepenog ukidanja proizvodnje PFOS-a u razvijenim zemljama početkom 2000-ih godina, proizvodnja se delimično premestila u Aziju, posebno u Kinu, gde je zabeležen porast proizvodnje sa oko 30 tona u 2002. godini na čak 247 tona u 2006. godini (Miralles-Marco i Harrad, 2015).

Zbog svoje perzistentnosti, bioakumulacije i toksičnosti, PFOS je prepoznat kao značajan globalni zagađivač. Naučni komitet za rizike po zdravlje i životnu sredinu (engl. *Scientific Committee of Health and Environmental Risks*, SCHER), jedan od nezavisnih naučnih komiteta kojima upravlja Generalni direktorat za zdravlje i zaštitu potrošača Evropske komisije, svrstao je PFOS među perzistentne organske zagađivače već 2006. godine. PFOS je 2009. godine uključen u Aneks B Stokholmske konvencije o perzistentnim organskim zagađivačima, što podrazumeva ograničenu upotrebu uz strogu kontrolu, a paralelno sa tim, i U.S. EPA je uvela regulatorne mere usmerene ka smanjenju i eliminaciji proizvodnje i upotrebe PFOS-a (Qian i sar., 2010; Pérez i sar., 2013; Mokra, 2021; Liang i sar., 2022). U Evropskoj uniji PFOS je dodatno regulisan kroz regulativu REACH, kojom su uvedena ograničenja u pogledu njegove proizvodnje, stavljanja na tržište i upotrebe (EFSA, 2020).

2.3.1.2. Prisustvo perfluorooktansulfonata u tkivima i telesnim tečnostima ljudi

Perfluorooktansulfonat u ljudski organizam najčešće dospeva putem unosa kontaminirane vode i hrane, ali može prodreti i kroz kožu (Miralles-Marco i Harrad, 2015). Pored direktne izloženosti PFOS-u, postoji i indirektna izloženost preko prekursorskih jedinjenja, kao što su perfluorooktanski sulfonamidi i sulfonamidoetanol, koji se u organizmu metabolišu u PFOS. Prema nekim autorima, ova konverzija može dovesti do povećanja koncentracije PFOS-a u organizmu za 40% (Miralles-Marco i Harrad, 2015). Zbog svoje izuzetne hemijske stabilnosti i otpornosti na biotransformaciju, PFOS se u organizmu akumulira u različitim tkivima i telesnim tečnostima, pri čemu su najviše koncentracije najčešće zabeležene u krvi (serumu i plazmi), jetri i bubrezima. Prisustvo PFOS-a potvrđeno je u serumu, punoj krvi, majčinom mleku, pupčanoj krvi i drugim

biološkim matricama, što ukazuje na kontinuiranu i široko rasprostranjenu izloženost ljudi ovom jedinjenju.

Nakon ulaska u organizam različitim putevima (oralno, inhalaciono ili dermalno), PFOS se u krvotoku transportuje vezan prvenstveno za proteine plazme, pre svega albumin, ali i LDL. Zbog svoje hidrofilno-lipofilne prirode i visokog afiniteta prema proteinskim strukturama, PFOS se ne akumulira u lipidnom tkivu u meri karakterističnoj za klasične lipofilne zagađivače, već se dominantno distribuira u organima sa izraženom perfuzijom, kao što su jetra, bubrezi, slezina i pluća (Lindstrom i sar., 2011; Pérez i sar., 2013). Studije biomonitoringa ukazuju da je jetra primarno mesto akumulacije PFOS-a u ljudskom organizmu. U analizi uzoraka jetre kod ispitanika bez profesionalne izloženosti, prosečna koncentracija PFOS-a iznosila je 18,7 ng/g tkiva, sa rasponom od nemerljivih vrednosti do 57 ng/g tkiva. Istovremeno, koncentracije u serumu iznosile su približno 17,7 ng/mL, pri čemu je odnos koncentracija između jetre i seruma bio oko 1,3:1, a u pojedinim slučajevima dostizao i 1,7:1 (Kärrman i sar., 2007). Ovi podaci ukazuju na blisku povezanost između koncentracija u krvi i ciljnom organu, ali i na izraženu sposobnost akumulacije u jetri. Dodatno, u uzorcima jetre sa različitim oblicima disfunkcije PFOS je detektovan u više od 90% slučajeva, sa koncentracijama u opsegu od 0,375 do 42,5 ng/g tkiva, dok je u kontrolnoj populaciji prisustvo i koncentracija ovog jedinjenja bila znatno niža, što ukazuje na potencijalnu povezanost između akumulacije PFOS-a i poremećaja funkcije jetre (Domingo, 2025).

Pored jetre, PFOS je detektovan i u drugim organima, uključujući bubrege, pluća, štitastu žlezdu, ali i u manjoj meri u mozgu i kostima. U plućima su izmerene koncentracije oko 28,4 ng/g tkiva, dok su u bubrezima vrednosti dostizale približno 55 ng/g tkiva, što ukazuje na značajan bioakumulacioni potencijal u ovim organima. Nasuprot tome, u mozgu i kostima zabeležene su znatno niže koncentracije (oko 1,9 ng/g i 0,89 ng/g tkiva, redom), što se dovodi u vezu sa ograničenim prolaskom PFOS-a kroz BBB i nižim afinitetom prema mineralizovanom tkivu (Pérez i sar., 2013; Koskela i sar., 2017).

Poseban značaj ima sposobnost PFOS-a da prolazi placentalnu barijeru i dospeva u organizam fetusa. Istraživanja na uzorcima placente i fetalnih organa pokazala su da se PFOS akumulira u tkivima fetusa, pri čemu su koncentracije u placenti iznosile oko 1,3 ng/g, dok su u organima fetusa bile približno 0,6 ng/g tkiva. Koncentracije PFOS-a u placenti predstavljale su oko 11–15% nivoa izmerenih u krvi majke, što ukazuje da je izloženost fetusa 7–20 puta niža u odnosu na majčinu, ali ipak značajna (Mamsen i sar., 2017).

Perinatalna izloženost PFOS-u može se ostvariti i putem majčinog mleka. PFOS je detektovan u svim analiziranim uzorcima majčinog mleka, sa prosečnim koncentracijama oko 0,2 ng/mL, što potvrđuje kontinuiranu izloženost novorođenčadi i u postnatalnom periodu (Kärrman i sar., 2007).

Brojne studije biomonitoringa su pokazale da se PFOS detektuje u krvi kod gotovo svih ispitanika u opštoj populaciji. Globalna medijana (P50) koncentracije PFOS-a u serumu procenjuje se na približno 4–10 ng/mL, uz značajne regionalne razlike (Ji i sar., 2025). U Severnoj Americi i Evropi, srednje vrednosti PFOS-a u serumu u ranijim studijama iznosile su oko 9–20 ng/mL (Corsini i sar., 2014; Ji i sar., 2025), dok su u novijim istraživanjima zabeležene niže vrednosti usled smanjenja obima proizvodnje i regulacije PFAS, često u opsegu 1–5 ng/mL (Pan i sar., 2024). U azijskim populacijama, koncentracije PFOS-a u serumu pokazuju veću varijabilnost, sa vrednostima koje se najčešće kreću između 5 i 35 ng/mL, uz vrednosti P50 oko 8–10 ng/mL (Hsu i sar., 2013). Slični opsezi zabeleženi su i u drugim delovima sveta, pri čemu se razlike pripisuju različitim izvorima izloženosti, regulatornim merama i životnim navikama. Važno je naglasiti da koncentracije PFOS-a u serumu zavise od starosti, pola i životnog stila, pri čemu se često beleže više vrednosti kod muškaraca i starijih osoba (Hsu i sar., 2013). Pored toga, u populacijama izloženim kontaminiranoj vodi za piće ili industrijskim izvorima, koncentracije PFOS-a u serumu mogu biti značajno povećane. Na primer, u pojedinim zajednicama sa zagađenim izvorima vode, vrednosti P50 za PFOS u serumu mogu dostići i preko 30 ng/mL (Xu i sar., 2021), a u nekim ekstremnim slučajevima i značajno više, preko 150 ng/mL (Li i sar., 2020), što višestruko prevazilazi tipične vrednosti za opštu populaciju.

Profesionalno izložene populacije predstavljaju posebnu kategoriju sa znatno višim nivoima PFOS-a u organizmu. Radnici u industrijama koje uključuju proizvodnju ili upotrebu PFAS (npr. hemijska industrija, galvanizacija, proizvodnja poluprovodnika i protivpožarne pene) pokazuju višestruko povećane koncentracije PFOS-a u serumu u odnosu na opštu populaciju. U takvim populacijama, koncentracije PFOS-a u serumu mogu dostići vrednosti od nekoliko stotina do više hiljada ng/mL. Na primer, studije su pokazale da se koncentracije PFOS-a kod profesionalno izloženih radnika kreću u opsegu od približno 145 do 3490 ng/mL (Corsini i sar., 2014). U pojedinim slučajevima, naročito kod radnika sa dužim radnim stažom, zabeležene su i ekstremno visoke vrednosti, sa srednjim koncentracijama većim od 1800 ng/mL (Fu i sar., 2016). Izuzetno visoki nivoi PFOS-a zabeleženi su i u pojedinačnim slučajevima profesionalne izloženosti, gde su koncentracije

dostizale čak nekoliko stotina ili hiljada ng/mL, a u ekstremnim slučajevima i preko 10 000–30 000 ng/mL (Olsen i sar., 1999). Ovakvi nalazi ukazuju na značajnu akumulaciju PFOS-a u organizmu usled dugotrajne i intenzivne izloženosti.

2.3.1.3. Metabolizam perfluorooktansulfonata

Perfluorooktansulfonat je veoma stabilno organsko jedinjenje koje se, za razliku od većine ksenobiotika, ne podvrgava klasičnoj metaboličkoj transformaciji u organizmu čoveka. Zbog prisustva snažnih kovalentnih veza između atoma ugljenika i fluora, PFOS je praktično metabolički inertan i u organizmu se zadržava u svom anjonskom obliku, vezan za proteine plazme i tkiva (Lindstrom i sar., 2011; Sunderland i sar., 2019). Za razliku od mnogih organskih zagađivača koji prolaze kroz faze I i II biotransformacije, PFOS ne podleže enzimskim reakcijama oksidacije, redukcije ili konjugacije, već se akumulira i eliminiše veoma sporo. U tom smislu, PFOS se može posmatrati kao krajnji produkt metaboličke transformacije različitih prekursora, uključujući perfluorooktansulfonamide i njihove derivate, koji se u organizmu mogu biotransformisati putem enzima citohroma P450, naročito izoenzima CYP2C9 i CYP2C19 (Miralles-Marco i Harrad, 2015). Nakon konverzije u PFOS, dalje metaboličke transformacije praktično ne postoje.

Jedna od ključnih karakteristika PFOS-a je izuzetno dugo poluvreme eliminacije iz organizma čoveka. Procene poluvremena eliminacije variraju u zavisnosti od studije i populacije, ali se najčešće navode vrednosti u opsegu od približno 3 do 5 godina (Olsen i sar., 2007; Li i sar., 2018). U pojedinim studijama zabeležene su i znatno duže vrednosti, koje mogu dostići više od 10 godina, pa čak i do 20–27 godina u specifičnim uslovima izloženosti ili metodološkim pristupima proceni (Geiger i sar., 2021; Mokra, 2021). Dugo zadržavanje PFOS-a u organizmu posledica je kombinacije nekoliko faktora, uključujući snažno vezivanje za proteine plazme, ograničenu biotransformaciju i efikasnu reapsorpciju u bubrezima. PFOS se filtrira u bubrežnim glomerulima, ali se u velikoj meri ponovo reapsorbuje u proksimalnim tubulima putem transportnih proteina (OAT), što značajno usporava njegovo izlučivanje (Han i sar., 2012; Zhang i sar., 2013). Izlučivanje PFOS-a odvija se prvenstveno putem urina i fecesa, dok se kod žena dodatni put eliminacije ostvaruje putem menstrualnog krvarenja, trudnoće i laktacije, što doprinosi nižim koncentracijama u odnosu na muškarce (Harada i sar., 2005; Verner i sar., 2016). Epidemiološke studije ukazuju na postojanje značajnih polnih razlika u kinetici PFOS-a. U proseku, žene imaju kraće poluvreme eliminacije u odnosu na muškarce, što se dovodi u vezu sa dodatnim

putevima eliminacije. Harada i saradnici (2005) pokazali su da žene u reproduktivnom periodu imaju niže koncentracije PFOS-a u serumu u poređenju sa muškarcima, dok se nakon menopauze ove razlike smanjuju. Novija istraživanja dodatno potvrđuju ovu pojavu, ukazujući da menstrualni ciklus, trudnoća i dojenje predstavljaju važne puteve eliminacije PFOS-a, dok se kod muškaraca i žena nakon menopauze PFOS eliminiše sporije i akumulira u većoj meri (Verner i sar., 2016; Arredondo Eve i sar., 2024).

2.3.1.4. Efekti perfluorooktansulfonata na kardiovaskularni sistem

Sve veća proizvodnja i široka primena PFOS-a, u kombinaciji sa njegovom izrazitom perzistentnošću, bioakumulacijom i dugim poluvremenom eliminacije, doveli su do intenziviranja istraživanja njegovih efekata na zdravlje ljudi. U tom kontekstu, sproveden je veliki broj epidemioloških i eksperimentalnih studija na *in vivo* i *in vitro* modelima sa ciljem razumevanja povezanosti između izloženosti PFOS-u i pojave različitih patoloških stanja (Sunderland i sar., 2019; EFSA, 2020).

Dosadašnja istraživanja ukazuju da PFOS ispoljava širok spektar bioloških efekata koji obuhvataju različite organske sisteme. Na nivou jetre, PFOS je povezan sa poremećajima lipidnog metabolizma, razvojem steatoze i povećanim rizikom od hepatotoksičnosti, uključujući i ozbiljna oboljenja kao što su ciroza i hepatocelularni karcinom (Rosen i sar., 2009; Yeung i sar., 2013). Eksperimentalne studije su pokazale da PFOS može aktivirati nuklearne receptore, uključujući receptore aktivirane peroksizomskim proliferatorom alfa i gama (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma*, PPAR-α/γ), što dovodi do promena u ekspresiji gena uključenih u metabolizam lipida i energetsku homeostazu (Vanden Heuvel i sar., 2006; Takacs i Abbott, 2007). Na nivou endokrinog sistema, PFOS može delovati kao endokrini ometač, ispoljavajući slabu estrogensku i antiestrogensku aktivnost u zavisnosti od koncentracije i prisustva hormona (Liao i sar., 2012). Takođe, povezan je sa poremećajima funkcije štitaste žlezde i promenama u nivou polnih hormona (Jensen i Leffers, 2008). Efekti PFOS-a zabeleženi su i na nivou imunskog sistema, gde može modulisati inflamacijske odgovore i smanjiti imunološku reaktivnost, kao i na nivou nervnog sistema, gde se dovodi u vezu sa neurotoksičnim efektima i razvojnim poremećajima (Grandjean i sar., 2012; Sunderland i sar., 2019). Pored toga, sve veći broj studija ukazuje na njegovu ulogu u razvoju metaboličkih poremećaja, uključujući dislipidemiju i insulinsku rezistenciju.

Tokom poslednjih godina sve je više epidemioloških studija koje ukazuju na povezanost između izloženosti PFOS-u i pojave KVB. Tako je pokazano da je izloženost PFOS-u u pozitivnoj korelaciji sa faktorima rizika za nastanak KVB, kao što su nivoi apolipoproteina B, ukupnog holesterola, LDL i triglicerida, kao i sa pojavom hipertenzije, insulinske rezistencije, gojaznosti i poremećaja metabolizma lipida (Nelson i sar., 2010; Zeng i sar., 2015; Averina i sar., 2021). Huang i saradnici (2018) su pokazali da je povećanje koncentracije PFOS-a u serumu u korelaciji sa većom prevalencom koronarne bolesti, srčane insuficijencije, angine pektoris, infarkta miokarda i moždanog udara, i to nezavisno od klasičnih faktora rizika za nastanak i razvoj KVB. Iako mehanizmi njegovog delovanja nisu u potpunosti razjašnjeni, dostupni podaci ukazuju na značajnu ulogu PFOS-a u razvoju ateroskleroze, hipertenzije i drugih poremećaja KVS-a. Epidemiološke studije su pokazale pozitivnu korelaciju između koncentracije PFOS-a u serumu i zadebljanja intime i medije karotidne arterije, što predstavlja rani marker ateroskleroze (Lin i sar., 2013). U istoj studiji uočen je izraženiji efekat kod žena, kao i kod osoba sa određenim genotipovima apolipoproteina E (E2 i E3/E3), što ukazuje na moguću genetičku modulaciju efekata PFOS-a. Pored toga, više studija je ukazalo na povezanost PFOS-a sa povišenim krvnim pritiskom, razvojem koronarne bolesti i drugim kardiovaskularnim poremećajima (Arredondo Eve i sar., 2024; Wu i sar., 2024). Meta-analize sugerišu da PFAS, uključujući PFOS, mogu doprineti povećanju ukupnog kardiovaskularnog rizika putem uticaja na lipidni profil i inflamacijske procese (Sunderland i sar., 2019).

Eksperimentalne studije na životinjama potvrđuju ove nalaze. Pokazano je da izlaganje PFOS-u, posebno u kombinaciji sa ishranom bogatom mastima, može dovesti do razvoja kardiomiopatije i strukturnih promena u srcu. Iako su koncentracije PFOS-a u srčanom tkivu relativno niske, njegov efekat se smatra posrednim, kroz sistemske inflamacijske mehanizme. Aktivacija signalnog puta nuklearnog faktora kapa-lakog lanca pojačivača aktiviranih B ćelija (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF-κB) i povećano oslobađanje proinflamacijskih citokina, poput IL-1β, doprinose razvoju kardiovaskularnih oštećenja. Pored toga, pokazano je i da PFOS utiče na razvoj srca, kontraktilnost miokarda, frekvenciju srčanog rada, fibrozu i ekspresiju inflamacijskih citokina, što ukazuje na direktnu kardiotoksičnost ove supstance (Huang i sar., 2011; Zeng i sar., 2015; Xu i sar., 2022). Dalje, studije na životinjskim modelima su pokazale da PFOS može ubrzati formiranje aterosklerotskih plakova u aorti, kao i povećati ekspresiju gena povezanih sa oksidativnim stresom i inflamacijom (Li i sar., 2025; Deng i sar., 2020).

Promene u lipidnom metabolizmu, uključujući povećanje odnosa ceramida C16/C24, dodatno ukazuju na njegov potencijalni aterogeni efekat (Deng i sar., 2020). Kod trudnih ženki pacova PFOS dovodi do gestacijske hipertenzije, vazokonstrikcije i smanjenog protoka krvi kroz matericu, što ukazuje na značajan uticaj ove supstance na regulaciju vaskularnog tonusa (Dangudubiyyam i sar., 2022).

Na ćelijskom nivou, endotelne ćelije predstavljaju jedno od ključnih mesta delovanja PFOS-a. Jedan od najvažnijih mehanizama uključuje povećano stvaranje ROS-a, što dovodi do oksidativnog stresa i aktivacije inflamacijskih signalnih puteva. Pokazano je da PFOS indukuje stvaranje ROS-a u humanim mikrovaskularnim endotelnim ćelijama (engl. *human microvascular endothelial cells*, HMVEC), kako pri visokim (50–100 μM), tako i pri nižim koncentracijama (2–5 μM) (Qian i sar., 2010). Povećano stvaranje ROS-a dovodi do aktivacije transkripcionih faktora i povećane ekspresije inflamacijskih medijatora, uključujući ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 i IL-6, čime se podstiče adhezija leukocita i razvoj inflamacijskog odgovora (Liao i sar., 2012). Ovi procesi predstavljaju ključne rane događaje u razvoju endotelne disfunkcije i ateroskleroze. Novija istraživanja ukazuju da PFOS može indukovati feroptozu, oblik regulisane ćelijske smrti zavisne od gvožđa, i lipidnu peroksidaciju u endotelnim ćelijama, što značajno narušava njihovu funkciju (Cui i sar., 2022). Pored toga, PFOS utiče na strukturu i funkciju citoskeleta endotelnih ćelija, dovodeći do remodelovanja aktinskih filamenata i povećanja permeabilnosti endotela. Ove promene narušavaju integritet vaskularne barijere i mogu doprineti razvoju inflamacije i drugih patoloških procesa (Qian i sar., 2010).

Ukupno posmatrano, dostupni podaci ukazuju da PFOS ispoljava višestruke efekte na KVS, koji su posledica kombinovanog delovanja na metabolizam lipida, inflamacijske procese i funkciju endotela. Iako su epidemiološki i eksperimentalni podaci u velikoj meri konzistentni, mehanizmi delovanja još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni, posebno na nivou ćelijskih modela poreklom od čoveka. Dalja istraživanja su neophodna kako bi se preciznije definisali molekularni putevi putem kojih PFOS doprinosi razvoju KVB.

2.3.2. Perfluorooktanska kiselina

2.3.2.1. Osnovne karakteristike i upotreba perfluorooktanske kiseline

Perfluorooktanska kiselina (hemijski naziv po IUPAC-u: 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-pentadekafluorooktanska kiselina, CAS# 335-67-1;

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Perfluorooctanoic-acid) predstavlja jednu od najznačajnijih i najrasprostranjenijih supstanci iz grupe PFAS. Strukturno, PFOA se sastoji od potpuno fluorisanog alkilnog lanca od osam ugljenikovih atoma, pri čemu su svi atomi vodonika zamenjeni fluorom, i terminalne karboksilne funkcionalne grupe (–COOH), po kojoj se razlikuje od PFOS-a, koji sadrži sulfonatnu grupu (Buck i sar., 2011). Molekulska formula PFOA-e je $C_8HF_{15}O_2$, a relativna molekulska masa iznosi 414,07 g/mol. Strukturna formula je prikazana na slici 2.10. Kao i PFOS, u fiziološkim uslovima se najčešće javlja u anjonskom obliku, što značajno utiče na njenu distribuciju i interakcije u biološkim sistemima.



Slika 2.10. Strukturna formula perfluorooktanske kiseline.

Za razliku od klasičnih hidrofobnih organskih zagađivača, PFOA poseduje izražena amfifilna svojstva – fluorovani lanac je hidrofoban i lipofoban, dok je karboksilna grupa hidrofilna. Ova kombinacija svojstava daje PFOA-i izuzetnu površinsku aktivnost, odnosno sposobnost smanjenja površinskog napona i interakcije sa vodom i lipidima, što je čini efikasnim surfaktantom (Buck i sar., 2011; Vierke i sar., 2012). Zahvaljujući svojim jedinstvenim fizičko-hemijskim svojstvima, PFOA je decenijama korišćena u različitim industrijskim i komercijalnim proizvodima. Najznačajnija primena bila je kao emulgator u proizvodnji fluoropolimera, uključujući politetrafluoroetilen (PTFE), poznatiji kao teflon, koji se koristi u nelepljivim premazima i industrijskim materijalima (Prevedouros i sar., 2006). Pored toga, PFOA je korišćena u proizvodnji vodootpornih i masnootpornih tekstila i kože, ambalaže za hranu otporne na mast, sredstava za zaštitu od mrlja (npr. premazi za tepihe i nameštaj), boja, lakova i voskova, protivpožarnih pena (AFFF), industrijskih maziva i sredstava za čišćenje (Vierke i sar., 2012; OECD, 2018).

Industrijska proizvodnja PFOA-e započela je sredinom XX veka i dostigla vrhunac krajem XX i početkom XXI veka. Procene ukazuju da je globalna proizvodnja PFOA-e i njenih prekursora bila značajna, pri čemu su najveći proizvođači bile Sjedinjene Američke Države i Kina. U Kini je, na primer, tokom perioda 2004–2012. proizvedeno 480 tona PFOA-e, uz značajne emisije u životnu sredinu, i do 250 tona (Li i sar., 2015). Zbog svoje

stabilnosti i mobilnosti, PFOA se lako transportuje na velike udaljenosti putem atmosfere i vodenih tokova, što je dovelo do njenog globalnog rasprostiranja, uključujući i udaljene regione kao što je Arktik (Vierke i sar., 2012).

Zabrinutost zbog potencijalnih zdravstvenih efekata PFOA-e dovela je do uvođenja brojnih regulatornih mera. Međunarodna agencija za istraživanje kancera (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) je 2015. godine klasifikovala PFOA-u kao mogući kancerogen za ljude (grupa 2B), dok je u novijoj klasifikaciji iz 2023. godine PFOA svrstana u grupu 1 – kancerogen za ljude, na osnovu dovoljno prikupljenih dokaza (Coperchini i sar., 2024). PFOA, njene soli i jedinjenja koja se mogu transformisati u PFOA-u uključena su 2019. godine u Aneks A Stokholmske konvencije o perzistentnim organskim zagađivačima, što podrazumeva njihovu eliminaciju ili strogu kontrolu upotrebe. Evropska unija je uvela ograničenja za PFOA-u u okviru regulative REACH, pri čemu su maksimalno dozvoljene koncentracije značajno smanjene (EFSA, 2020). Istovremeno, U.S. EPA je zaključila dobrovoljne sporazume sa industrijom (npr. *PFOA Stewardship Program*) u cilju postepenog ukidanja proizvodnje i upotrebe PFOA-e (U.S. EPA, 2025). SCHER je svrstao PFOA-u među perzistentne organske zagađivače, a već 2020. godine zabranjena je njena proizvodnja i upotreba, osim uz striktna ograničenja (Vierke i sar., 2012; Badry i sar., 2025).

2.3.2.2. Prisustvo perfluorooktanske kiseline u tkivima i telesnim tečnostima ljudi

Iako je proizvodnja i upotreba PFOA-e u mnogim zemljama značajno smanjena ili u potpunosti ukinuta, zahvaljujući njenoj postojanosti i bioakumulacionom potencijalu, ljudi su i dalje izloženi ovom jedinjenju putem različitih izvora, uključujući kontaminiranu vodu za piće, hranu, kućnu prašinu i potrošačke proizvode (Sunderland i sar., 2019; EFSA, 2020). Za razliku od PFOS-a, PFOA pokazuje nešto niži stepen bioakumulacije, ali je i dalje široko rasprostranjena u ljudskom organizmu, pri čemu se detektuje u različitim tkivima i telesnim tečnostima.

Studije biomonitoringa ukazuju da se PFOA distribuira u više organa, uključujući jetru, bubrege, pluća, kosti, slezinu i mozak. U poređenju sa PFOS-om, koncentracije PFOA-e u tkivima su generalno niže, ali pokazuju sličan obrazac raspodele sa dominantnim prisustvom u organima koji se odlikuju visokim stepenom perfuzije. Analizom uzoraka jetre u Danskoj kod ispitanika bez profesionalne izloženosti utvrđene su koncentracije PFOA-e u opsegu od 0,5 do 1,45 ng/g tkiva, dok je odnos koncentracija između seruma i jetre iznosio približno 5:1, što ukazuje na dominantnu prisutnost PFOA-e u cirkulaciji (Nielsen i sar.,

2024). U drugim studijama prijavljene su i nešto više koncentracije u jetri, do oko 3,1 ng/g tkiva (Hartmann i sar., 2024). Detaljnije analize distribucije PFOA-e u različitim tkivima, sprovedene primenom tečne hromatografije u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (LC-MS/MS), pokazale su da su najviše koncentracije zabeležene u plućima (do 3,8 ng/g), bubrezima (oko 3,5 ng/g) i jetri (oko 3,1 ng/g). U endokrinim organima, kao što su štitasta žlezda i hipofiza, koncentracije su bile nešto niže (2,0–2,3 ng/g), dok su u masnom tkivu i pankreasu izmerene vrednosti oko 1,3–1,4 ng/g tkiva. Najniže koncentracije PFOA-e zabeležene su u mozgu, bazalnim ganglijama i skeletnim mišićima (0,3–0,6 ng/g), što se dovodi u vezu sa ograničenim prolaskom kroz BBB i nižim afinitetom prema ovim tkivima (Pérez i sar., 2013; Hartmann i sar., 2024). Zanimljivo je da su u pojedinim studijama relativno visoke koncentracije PFOA-e detektovane u kostima. Analizom uzoraka iz Katalonije izmerene su srednje vrednosti od oko 20 ng/g, što ukazuje da koštano tkivo može predstavljati značajan depo ovog jedinjenja (Pérez i sar., 2013). Ovaj nalaz se dovodi u vezu sa dugotrajnim zadržavanjem PFOA-e u organizmu i potencijalnom ulogom kostiju kao rezervoara ovog jedinjenja.

Perfluorooktanska kiselina je široko rasprostranjena u telesnim tečnostima, uključujući krv, majčino mleko i pupčanu krv, što ukazuje na kontinuiranu izloženost ljudi tokom života. U majčinom mleku, PFOA je detektovana u velikom procentu uzoraka (98%). U studiji Antignac i saradnika (2013), koncentracije su se kretale u opsegu od <50 do 220 ng/L, dok su u drugim studijama zabeležene prosečne vrednosti oko 40–50 ng/L (Tao i sar., 2008). Takođe je uočeno da su koncentracije PFOA-e više kod majki koje prvi put doje, što ukazuje na kumulativni efekat i eliminaciju putem laktacije. PFOA je prisutna i u pupčanoj krvi, što potvrđuje njen prelazak kroz placentalnu barijeru i izloženost fetusa tokom intrauterinog razvoja (Gützkow i sar., 2012).

Serum predstavlja najčešće korišćenu matricu za procenu izloženosti PFOA-i. Epidemiološke studije pokazuju da se PFOA detektuje u krvi kod većine ljudi u opštoj populaciji širom sveta. U Sjedinjenim Američkim Državama, studije su pokazale prisustvo PFOA-e kod više od 95% ispitanika, sa srednjim koncentracijama koje se kreću oko 2–8 ng/mL u novijim istraživanjima (Cao i sar., 2022). U evropskim populacijama zabeleženi su slični opsezi koncentracija, najčešće između 1 i 10 ng/mL, uz određene regionalne varijacije (EFSA, 2020). Studija sprovedena u Poljskoj pokazala je koncentracije PFOA-e u serumu u opsegu od 0,67 do 12,56 ng/mL, pri čemu su više vrednosti zabeležene kod muškaraca u odnosu na žene, što je u skladu sa ranijim nalazima o polnim razlikama u bioakumulaciji

(Harada i sar., 2005; Góralczyk i sar., 2015). U populacijama izloženim kontaminiranoj vodi za piće ili industrijskim izvorima, koncentracije PFOA-e u serumu mogu biti značajno više, često preko 10–50 ng/mL, a u pojedinim slučajevima i znatno više (Emmett i sar., 2006).

Profesionalno izložene populacije predstavljaju grupu sa najvišim koncentracijama PFOA-e u organizmu. Radnici u industrijama koje uključuju proizvodnju ili upotrebu fluoropolimera i PFAS često imaju višestruko veće koncentracije u serumu u poređenju sa opštom populacijom. Studije su pokazale da koncentracije PFOA-e u serumu radnika mogu dostići vrednosti od nekoliko desetina do više stotina ng/mL. Emmett i saradnici (2006) su izmerili srednje koncentracije od oko 490 ng/mL kod radnika u fabrici za proizvodnju PFOA-e, dok su kod stanovnika u okolini fabrike izmerene vrednosti oko 354 ng/mL. Još više koncentracije zabeležene su u studiji Kanetani i saradnika (2025), gde su kod radnika fabrike u Japanu izmerene srednje vrednosti od 192,6 ng/mL, dok su maksimalne koncentracije dostizale čak 596,6 ng/mL. Ovi nalazi ukazuju na izuzetno visok nivo izloženosti i akumulacije PFOA-e u profesionalnim uslovima.

2.3.2.3. Metabolizam perfluorooktanske kiseline

Perfluorooktanska kiselina predstavlja izuzetno stabilno jedinjenje koje, usled prisustva snažnih kovalentnih veza između atoma ugljenika i fluora, ne podleže klasičnoj biotransformaciji ni u životnoj sredini ni u organizmu čoveka. Kao i PFOS, PFOA se smatra metabolički inertnom supstancom koja se u organizmu zadržava u svom anjonskom obliku, bez značajne razgradnje pod delovanjem enzima (Lindstrom i sar., 2011; Sunderland i sar., 2019). Nakon ulaska u organizam putem ingestije, inhalacije ili dermalne apsorpcije, PFOA se brzo resorbuje u krvotok i distribuira u različite organe. Zbog svoje amfifilne prirode i visokog afiniteta prema proteinima plazme, posebno albuminu, PFOA se transportuje kroz cirkulaciju i akumulira u organima sa visokim sadržajem proteina, kao što su jetra i bubrezi (Weaver i sar., 2010; Han i sar., 2012).

Jedna od ključnih karakteristika PFOA-e jeste relativno dugo poluvreme eliminacije iz organizma čoveka, koje je, međutim, kraće u poređenju sa PFOS-om. Brojne epidemiološke studije procenile su poluvreme eliminacije PFOA-e u opsegu od približno 2 do 4 godine. Olsen i saradnici (2007) su praćenjem koncentracija PFOA-e kod bivših radnika fabrike za proizvodnju fluoropolimera tokom petogodišnjeg perioda procenili srednje poluvreme eliminacije od oko 3,8 godina. Novija istraživanja ukazuju na nešto kraće poluvreme, u opsegu od oko 2,0 do 2,5 godine, uz izražene individualne razlike (Bartell i

sar., 2010; Li i sar., 2018). U studiji koja je obuhvatila više hiljada ispitanika, pokazano je da je poluvreme eliminacije PFOA-e duže kod muškaraca (oko 2,3 godine) nego kod žena (oko 2,0 godine), što se dovodi u vezu sa dodatnim putevima eliminacije kod žena, uključujući menstruaciju, trudnoću i laktaciju (Batzella i sar., 2024). Takođe, na brzinu eliminacije utiču faktori kao što su starost, način života (npr. konzumiranje nikotina i alkohola), funkcija bubrega i nivo izloženosti.

Eliminacija PFOA-e iz organizma odvija se prvenstveno putem bubrega, kroz kombinaciju glomerularne filtracije, tubularne sekrecije i reapsorpcije. Iako se PFOA efikasno filtrira u glomerulima, veliki deo se ponovo reapsorbuje u proksimalnim tubulima, što značajno smanjuje ukupnu ekskreciju i produžava vreme zadržavanja u organizmu (Han i sar., 2012; Zhang i sar., 2013). Ključnu ulogu u transportu PFOA-e imaju OAT, posebno OAT1 i OAT3, koji omogućavaju ulazak PFOA-e iz krvi u epitelne ćelije proksimalnih tubula. Nakon toga, PFOA može biti sekretovana u lumen tubula, ali i ponovo reapsorbovana u krvotok, čime se uspostavlja efektivni ciklus recirkulacije (Weaver i sar., 2010; Liu i sar., 2023). Ovaj proces značajno doprinosi dugom poluvremenu eliminacije i predstavlja ključni mehanizam bioakumulacije PFOA-e u organizmu čoveka. Kao i kod PFOS-a, uočene su značajne polne razlike u kinetici PFOA-e. Žene, posebno u reproduktivnom periodu, pokazuju bržu eliminaciju ovog jedinjenja u odnosu na muškarce, što se pripisuje dodatnim putevima eliminacije putem menstrualnog ciklusa, trudnoće i dojenja (Harada i sar., 2005; Verner i sar., 2016). Kod muškaraca i žena nakon menopauze, eliminacija PFOA-e je sporija, što dovodi do većih koncentracija u serumu i potencijalno većeg rizika od akumulacije (Arredondo Eve i sar., 2024).

2.3.2.4. Efekti perfluorooktanske kiseline na kardiovaskularni sistem

Perfluorooktanska kiselina, kao jedno od najviše istraživanih jedinjenja iz grupe PFAS, pokazuje širok spektar bioloških efekata na nivou organizma. Zbog svoje perzistentnosti, bioakumulacije i dugog poluvremena eliminacije, PFOA predstavlja značajan zdravstveni rizik, što je potvrđeno brojnim epidemiološkim i eksperimentalnim studijama na *in vivo* i *in vitro* modelima (Sunderland i sar., 2019; EFSA, 2020).

Kada se posmatraju opšti efekti PFOA-e na nivou organizma, pokazano je da izlaganje ovoj supstanci dovodi do poremećaja u metabolizmu lipida, razvoja steatoze i promena u ekspresiji gena uključenih u β-oksidaciju masnih kiselina u jetri. Ovi efekti su prvenstveno posredovani aktivacijom nuklearnih receptora, naročito PPARα (Vanden

Heuvel i sar., 2006; Rosen i sar., 2009). PFOA takođe deluje kao endokrini ometač, pri čemu je pokazano da utiče na funkciju štitaste žlezde i metabolizam steroidnih hormona (Jensen i Leffers, 2008). Na nivou imunskog sistema, povezuje se sa smanjenom imunološkom reaktivnošću i povećanom osetljivošću na infekcije, dok su na nivou metabolizma zabeležene promene koje uključuju dislipidemiju, insulinsku rezistenciju i povećan rizik od metaboličkog sindroma (Grandjean i sar., 2012; Sunderland i sar., 2019). PFOA je takođe povezana sa poremećajima bubrežne funkcije i povećanjem nivoa mokraćne kiseline u serumu, što predstavlja dodatni faktor rizika za razvoj KVB (Shankar i sar., 2012).

U poslednjoj deceniji sve veći broj epidemioloških studija ukazuje na značajnu povezanost između izloženosti PFOA-i i povećanog rizika od razvoja KVB. Analize velikih populacionih kohorti pokazale su pozitivnu korelaciju između koncentracija PFOA-e u serumu i pojave kardiovaskularnih poremećaja, uključujući bolesti perifernih arterija, čak i nakon isključivanja tradicionalnih faktora rizika kao što su starost, pušenje, dijabetes i hipertenzija (Shankar i sar., 2012). Pored toga, zabeležena je povezanost između koncentracija PFOA-e u serumu i povišenih nivoa homocisteina, kao i povećanog sistolnog krvnog pritiska, što ukazuje na potencijalnu ulogu u razvoju hipertenzije (Min i sar., 2012). Novije studije dodatno potvrđuju povezanost PFOA-e sa dislipidemijom, aterosklerozom i povećanim rizikom od akutnog koronarnog sindroma (Sunderland i sar., 2019; Li i sar., 2023).

Eksperimentalne studije na model organizmima pružaju dokaze o kardiotoksičnim efektima PFOA-e. Istraživanja na pilećim embrionima pokazala su da izlaganje PFOA-i dovodi do strukturnih promena u srčanom tkivu, uključujući smanjenje debljine miokarda i poremećaje u razvoju srčanih komora. Ovi efekti povezani su sa aktivacijom PPARα, koji ima ključnu ulogu u regulaciji energetskog metabolizma srca i njegovog razvoja (Jiang i sar., 2012; Zhao i sar., 2017). Liu i saradnici (2024) su na modelu embriona zebrice (*Danio rerio*) pokazali da PFOA indukuje oksidativni stres u kardiomiocitima preko signalnog puta Keap1/Nrf2, što dovodi do oksidativnog oštećenja srčanog mišića. Pored toga, zabeleženi su i funkcijski poremećaji, uključujući aritmije, smanjenje srčanog volumena i ejekcione frakcije, što ukazuje na direktan uticaj na srčanu funkciju tokom razvoja. U studiji na miševima, Rebholz i saradnici (2016) su pokazali da izlaganje PFOA-i dovodi do hiperholesterolemije i dislipidemije, uz promene u ekspresiji gena uključenih u lipidni metabolizam i inflamacijske procese, što može doprineti razvoju ateroskleroze i drugih KVB.

Iako su epidemiološki i *in vivo* podaci relativno konzistentni, broj studija koje direktno ispituju efekat PFOA-e na vaskularni endotel i dalje je ograničen, posebno u ćelijskim modelima poreklom od čoveka. Dostupni podaci ukazuju da PFOA može doprineti poremećaju endotelne homeostaze, ali mehanizmi nisu u potpunosti razjašnjeni. Sugerisano je da PFOA može indukovati oksidativni stres i inflamacijske procese koji potencijalno doprinose endotelnoj disfunkciji, ali su ovi mehanizmi češće indirektno procenjivani nego direktno dokazani na endotelnim ćelijama. Noviji eksperimentalni podaci dodatno podržavaju pretpostavku da je endotel važna meta delovanja PFOA-e, ali istovremeno pokazuju da efekti mogu biti specifični za pojedine vaskularne barijere i ćelijske sisteme. Na primer, studija na endotelnim ćelijama BBB goveđeg porekla pokazala je da izlaganje PFAS, uključujući PFOA-u, remeti progresiju ćelijskog ciklusa i proliferativni kapacitet endotelnih ćelija, što ukazuje na mogućnost narušavanja integriteta i obnove endotelnog monosloja (Gonella i sar., 2025). Pored toga, na modelu retinalne angiogeneze pokazano je da PFOA može indukovati patološku angiogenezu posredno, putem proinflamacijske aktivacije mikroglije i povećanog lučenja VEGFA (Yuan i sar., 2025). Ovaj nalaz je važan jer pokazuje da PFOA može promeniti vaskularno okruženje i podstaći abnormalnu angiogenezu, ali ujedno ukazuje da efekti PFOA-e na vaskularni sistem mogu biti i indirektni, posredovani ćelijama mikrookruženja, a ne isključivo posledica direktnog dejstva na endotelne ćelije. Ukupno posmatrano, dostupni podaci ukazuju da PFOA može uticati na funkciju endotela kroz kombinaciju promena u proliferaciji, oksidativnom statusu i vaskularnoj signalizaciji, ali su potrebna dodatna istraživanja kako bi se precizno definisali molekularni mehanizmi, posebno u modelima vaskularnog endotela čoveka.

2.4. Novi metodološki pristupi u toksikološkim istraživanjima

Identifikacija i evaluacija toksičnosti različitih industrijskih i drugih hemikalija i analiza njihovog štetnog uticaja na zdravlje ljudi vrši se sa krajnjim ciljem donošenja zakonskih mera koje imaju za cilj regulisanje upotrebe i korišćenja ovih supstanci. Prikupljanje podataka o hemijskim supstancama za koje postoji ograničen broj dostupnih informacija predstavlja značajan izazov za regulatorne agencije širom sveta. Pored toga, potražnja za raznim industrijskim hemikalijama na globalnom nivou je u stalnom porastu, te se u narednim godinama očekuje dodatno povećanje u obimu proizvodnje potencijalno toksičnih materija. Trenutna procena toksičnosti hemikalija se u velikoj meri oslanja na tradicionalne pristupe koji podrazumevaju *in vivo* istraživanja na laboratorijskim

životinjama i epidemiološke studije. Iako se ovi pristupi primenjuju već decenijama unazad, često ne pružaju detaljan uvid u molekularne mehanizme toksičnosti ispitivane hemikalije, dok su istovremeno vremenski i finansijski zahtevni. S druge strane, mnoge hemikalije koje su ranije bile u upotrebi su tokom vremena zamenjene strukturno sličnim, alternativnim hemikalijama, što zahteva nova, dugotrajna istraživanja i otežava toksikološku procenu rizika (Matteo i sar., 2023). Uzimajući u obzir sve navedeno, neophodne su savremene, moćnije toksikološke analize koje bi omogućile efikasniju karakterizaciju interakcija između organizma i ksenobiotika, obezbedile testiranje velikog broja novih hemikalija i neispitanih materijala, smanjile vreme i troškove koji su potrebni za procenu bezbednosti hemikalija, ali i upotrebu životinja u toksikološkim testiranjima.

Značajan zaokret u proceni toksičnosti hemikalija započeo je pre nepune dve decenije, kada je Nacionalna Akademija Nauka SAD 2007. godine objavila izveštaj pod nazivom „*Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*". U ovom dokumentu su predložene fundamentalne promene u proceni rizika od izloženosti hemikalijama, koje podrazumevaju prelazak sa tradicionalnih ispitivanja na životinjama na ćelije i tkiva poreklom od čoveka, razvoj visokoprotočnih (engl. *high-throughput*) metoda za analizu velikog broja hemijskih supstanci, kao i korišćenje računarskih i bioinformatičkih alata za integraciju i interpretaciju podataka (Krewski i sar., 2010). U skladu sa tim preporukama, U.S. EPA je u septembru 2019. godine objavila memorandum po kom se obavezala na postepeno smanjenje finansiranja i sprovođenja *in vivo* istraživanja za 30% do 2025. godine, uz dugoročan cilj njihovog potpunog ukidanja do 2035. godine (Andersen i sar., 2019).

Toksikološki profili hiljada supstanci, uključujući PFAS, i dalje su nedovoljno karakterisani. U tom kontekstu, tradicionalni toksikološki parametri, poput najviše doze bez uočenih štetnih efekata (engl. *no-observed-adverse-effect level,* NOAEL) i najniže doze sa uočenim štetnim efektima (engl. *lowest-observed-adverse-effect level*, LOAEL), sve češće se dopunjuju ili u potpunosti zamenjuju NAM-ove, uz primenu *in vitro*, *in silico*, *in chemico* i *ex vivo* sistema (Addicks i sar., 2023; Fragki i sar., 2023). NAM-ovi predstavljaju skup inovativnih metoda i tehnologija koje se koriste za procenu toksičnosti hemikalija, sa ciljem smanjenja oslanjanja na tradicionalne *in vivo* modele. Njihova primena omogućava brže, mehanistički utemeljenije i etički prihvatljivije dobijanje podataka relevantnih za procenu rizika po zdravlje ljudi i životnu sredinu (Andersen i sar., 2019). U savremenoj proceni hemikalija za koje postoje ograničeni toksikološki podaci sve češće se koriste *in silico* modeli, visokoprotočno testiranje (engl. *high-throughput screening*, HTS), napredni *in vitro*

sistemi, ekstrapolacija rezultata iz *in vitro* u *in vivo* uslove (engl. *in vitro-to-in vivo extrapolation*, IVIVE), kao i „read-across“ pristupi zasnovani na strukturnoj i biološkoj sličnosti supstanci.

Visokoprotočna transkriptomika (engl. *high-throughput transcriptomics*, HTT) predstavlja jedan od ključnih alata u okviru NAM-ova. Ova tehnologija omogućava brzo i paralelno dobijanje podataka o promenama u ekspresiji velikog broja gena na nivou celog genoma nakon izloženosti hemikalijama, analizom RNK izolovane iz ćelija. Za razliku od klasičnih toksikoloških analiza, koje se često zasnivaju na apikalnim krajnjim ishodima, HTT obezbeđuje kvantitativne podatke o ranim molekulskim promenama, što omogućava identifikaciju transkriptomskih početnih tačaka (engl. *point of departure*, PoD) (Reardon i sar., 2021; Rowan-Carroll i sar., 2021). Ključna prednost HTT pristupa jeste mogućnost primene modelovanja odnosa doza–odgovor na nivou pojedinačnih gena ili signalnih puteva, čime se izračunavaju vrednosti granične koncentracije (engl. *benchmark concentration*, BMC) i odgovarajući intervali pouzdanosti (Yang i sar., 2007; Phillips i sar., 2019). Vrednosti BMC-ova predstavljaju kvantitativne molekulske PoD-ove, zasnovane na promenama u ekspresiji gena, i omogućavaju precizniju procenu osetljivosti bioloških sistema u poređenju sa tradicionalnim NOAEL/LOAEL pristupom (Harrill i sar., 2019). Agregacijom vrednosti BMC-ova na nivou gena ili bioloških procesa moguće je identifikovati najosetljivije molekulske događaje i definisati referentne koncentracije relevantne za procenu rizika. Dalje, integracijom BMC podataka sa toksikokinetičkim modelima, uključujući PBTK i pristup IVIVE, moguće je konvertovati bioaktivne koncentracije dobijene u uslovima *in vitro* u HED-ove (Judson i sar., 2011; Wetmore, 2015). Na taj način HTT ne predstavlja samo alat za identifikaciju mehanizama delovanja, već i kvantitativnu osnovu za translaciju molekulskih promena u procenu rizika na nivou populacije. Ovakav integrisani pristup omogućava povezivanje ranih transkriptomskih odgovora sa realnim scenarijima izloženosti, čime se značajno povećava regulatorna relevantnost HTT podataka (Wambaugh i sar., 2015).

Primena HTT pristupa doprinosi efikasnoj proceni velikog broja supstanci, identifikaciji mehanizama njihovog delovanja i proceni potencijalnog rizika za hemikalije sa ograničenim toksikološkim podacima, što pruža regulatornim agencijama mehanistički utemeljene informacije relevantne za donošenje odluka o bezbednim nivoima izloženosti (Matteo i sar., 2023). Matteo i saradnici (2023) su analizirali bisfenol A (engl. *bisphenol A*, BPA) i 15 strukturno srodnih jedinjenja u koncentracijama od 0,0005 do 100 μM na ćelijskoj

liniji humanog karcinoma dojke MCF-7 tokom 48 h, primenom tehnologije TempO-Seq, sa ciljem ispitivanja promena u globalnoj ekspresiji gena povezanih sa aktivnošću estrogenskog receptora α. Rezultati su pokazali da ispitivana jedinjenja izazivaju različite nivoe estrogenske aktivnosti, što potvrđuje potencijal HTT pristupa za identifikaciju supstanci koje deluju kao endokrini ometači, kao i za procenu njihove relativne potentnosti u poređenju sa referentnim jedinjenjima.

Ukupno posmatrano, primena NAM-ova omogućava detaljnije razumevanje molekularnih mehanizama toksičnosti, precizniju karakterizaciju bioloških puteva uključenih u nastanak štetnih efekata, kao i unapređenje transparentnosti, reproduktivnosti i kvantitativne utemeljenosti procene rizika. Integracijom podataka dobijenih primenom različitih NAM-ova, uključujući HTT, BMC modelovanje, IVIVE i PBTK modele, u okviru koncepta integrisane procene rizika, moguće je doneti pouzdane i naučno utemeljene regulatorne odluke. Ovakav pristup doprinosi povećanju relevantnosti podataka za čoveka, uz istovremeno smanjenje upotrebe eksperimentalnih životinja u skladu sa principima 3R (engl. *Replacement, Reduction, Refinement*) (Abdullah i sar., 2016; Andersen i sar., 2019).

2.4.1. Toksikokinetičko modelovanje zasnovano na fiziologiji čoveka

PBTK modeli imaju dugu istoriju razvoja, počevši od radova Teorella iz 1937. godine, kada su postavljeni temelji matematičkog modelovanja distribucije supstanci u organizmu. Tokom 1970-ih godina razvijene su prve pojednostavljene simulacije koje su zahtevale velike količine *in vivo* podataka o koncentracijama supstanci u tkivima životinja. Danas se PBTK modeli razvijaju kao kompleksni, mehanistički zasnovani računarski sistemi koji omogućavaju predviđanje toksiko/farmakokinetike hemikalija i lekova, kao i kvantitativnu procenu rizika simulacijom različitih scenarija izloženosti (Jones i Rowland-Yeo, 2013). Konstruišu se primenom diferencijalnih jednačina i predstavljaju kvantitativni, mehanistički zasnovan pristup koji simulira kruženje hemikalija i njihovih metabolita preko apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja (engl. *absorption, distribution, metabolism and excretion*, ADME) u organizmu čoveka. PBTK modeli integrišu fiziološke parametre (protok krvi, zapreminu i masu organa), biohemijske karakteristike (aktivnost enzima i kapacitet metabolizma) i fizičko-hemijske osobine supstanci (rastvorljivost, logP i stepen jonizacije), čime omogućavaju kvantitativno povezivanje nivoa izloženosti sa koncentracijama supstance u krvi i tkivima. Posebno značajnu ulogu imaju u primeni reverzne dozimetrije (engl. *reverse dosimetry*), kojom se procenjuje nivo spoljašnje

izloženosti potreban za postizanje određene koncentracije supstance u krvi ili ciljnim tkivima. U tom kontekstu, PBTK modeli predstavljaju ključni alat za sprovođenje kvantitativne ekstrapolacije podataka dobijenih u uslovima *in vitro* na *in vivo* uslove (Jones i Rowland-Yeo, 2013; Lin i Lin., 2020; Stevanoska i sar., 2024).

Interesovanje za primenu reverzne dozimetrije u kombinaciji sa PBTK modelovanjem u stalnom je porastu, jer ovakav pristup omogućava određivanje početnih tačaka za procenu rizika (PoD), koje se dalje koriste za izračunavanje referentne doze (engl. *reference dose*, RfD), prihvatljivog dnevnog unosa (engl. *acceptable daily intake*, ADI) ili tolerabilnog dnevnog unosa (engl. *tolerable daily intake*, TDI), najčešće izraženih u mg/kg telesne mase (tm)/dan. Tradicionalno, vrednosti PoD-ova određuju se na osnovu krivih odnosa doze i odgovora dobijenih u *in vivo* studijama, pri čemu se koriste metričke vrednosti kao što su BMC, donja granica intervala pouzdanosti (engl. *BMC lower confidence limit*, BMCL) i gornja granica intervala pouzdanosti (engl. *BMC upper confidence limit*, BMCU). U okviru savremenih NAM pristupa, vrednosti BMC-ova i BMCL-ova mogu se dobiti iz transkriptomskih podataka generisanih u uslovima *in vitro*, a zatim primenom PBTK modelovanja prevesti u ekvivalentne nivoe spoljašnje izloženosti. U poređenju sa pristupom zasnovanim na vrednostima NOAEL i LOAEL, metodologija BMC/BMCL smatra se preciznijom, jer koristi celokupan skup podataka sa krive odnosa doze i odgovora, čime se smanjuje zavisnost procene od izbora pojedinačnih eksperimentalnih doza (Abdullah i sar., 2016; Li i sar., 2017; Lin i Lin, 2020).

Jedan od ključnih koraka u okviru IVIVE/PBTK pristupa jeste povezivanje biološki aktivnih koncentracija dobijenih u uslovima *in vitro* sa koncentracijama koje se mogu očekivati u organizmu čoveka nakon spoljašnje izloženosti. U tom kontekstu, PBTK modelovanje omogućava translaciju vrednosti PoD-ova, BMC-ova ili BMCL-ova u HED-ove, koji se mogu direktno koristiti u proceni rizika. U zavisnosti od dostupnih podataka, *in vitro* koncentracije mogu se povezati sa procenjenim ravnotežnim koncentracijama u plazmi (engl. *steady-state concentration*, Css) ili drugim relevantnim internim koncentracijama, koje se zatim koriste za procenu nivoa spoljašnje izloženosti primenom reverzne dozimetrije (Chou i Lin, 2020; Lin i Lin, 2020). Na primer, istraživanje sprovedeno na HepaRG ćelijama, primenom reverzne dozimetrije i PBTK modelovanja, omogućilo je određivanje vrednosti PoD-ova za pojedina PFAS jedinjenja za koja ranije nisu postojali adekvatni toksikološki podaci. Povezivanjem *in vitro* koncentracija sa procenjenim internim koncentracijama kod ljudi, uz primenu BMC modelovanja, procenjeni su nivoi izloženosti PFAS povezani sa

poremećajima funkcije jetre (Fragki i sar., 2023). S tim u vezi, mnoge studije danas sugerišu da kombinacija *in vitro* modela, PBTK modelovanja i reverzne dozimetrije može pouzdano predvideti toksične efekte supstanci kod različitih vrsta, pri čemu su procenjene vrednosti HED-ova u dobroj saglasnosti sa podacima dobijenim iz klasičnih eksperimentalnih studija na životinjama.

Pored toga, vrednosti HED-ova mogu se uporediti sa procenjenim nivoima izloženosti populacije radi izračunavanja odnosa bioaktivne doze i izloženosti (engl. *bioactive exposure ratio*, BER). BER predstavlja odnos između biološki aktivne doze ili koncentracije izvedene iz eksperimentalnih podataka i procenjene izloženosti ljudi. Drugim rečima, BER predstavlja konceptualni „most" između podataka dobijenih u uslovima *in vitro* i realnih scenarija izloženosti, jer omogućava poređenje nivoa izloženosti koji izazivaju biološki odgovor sa stvarnim nivoima izloženosti u populaciji. Vrednost BER-a manja od 1 ukazuje na značajno preklapanje između biološki aktivnih koncentracija i realne izloženosti, odnosno na to da je populacija izložena koncentracijama ispitivane supstance koje mogu izazvati biološki odgovor. Međutim, i vrednosti BER-ova u opsegu od 1 do 100 smatraju se potencijalno zabrinjavajućim, jer ukazuju na relativno malu marginu između eksperimentalno utvrđenih efekata i realne izloženosti. Ovaj opseg je definisan kao prag od regulatornog značaja u radu Gannon i saradnika (2019). Nasuprot tome, više vrednosti BER-ova (>100) ukazuju na veću marginu sigurnosti, odnosno na to da je izloženost ljudi značajno niža od koncentracija koje izazivaju odgovor u laboratorijskim uslovima (Gannon i sar., 2019). Rowan-Carroll i saradnici (2021) pokazali su da vrednosti BER-ova dobijene na osnovu transkriptomskih podataka za PFOS i PFOA-u na modelu 3D jetrenih sferoida dobro koreliraju sa nalazima iz *in vivo* studija na glodarima, čime je dodatno potvrđen regulatorni potencijal i značaj NAM-ova.

Uzimajući sve navedeno u obzir, kombinacija *in vitro* sistema, *in silico* pristupa i PBTK modelovanja predstavlja okvir za savremenu procenu rizika hemikalija poput PFAS, čiji toksikološki profili još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Ovakav integrisani pristup omogućava identifikaciju mehanizama toksičnosti, kvantitativnu translaciju molekulskih odgovora u realne scenarije izloženosti i smanjenje obima *in vivo* eksperimenata, čime se doprinosi efikasnijem i naučno utemeljenijem donošenju odluka od strane regulatornih agencija.

2.4.2. Softverski alati u obradi toksikogenomskih podataka

Kao što je ranije napomenuto, primena NAM-ova generiše podatke o velikom broju molekulskih promena u ćeliji ili tkivu. Mikročipovi, sekvenciranje nove generacije (engl. *next-generation sequencing*, NGS) i srodne „-omiks“ platforme omogućavaju da se, pored promena u ekspresiji gena, prate i epigenetske, proteomske i metabolomske promene, čime se značajno produbljuje razumevanje mehanizama toksičnosti. Ipak, količina i složenost dobijenih podataka predstavljaju jedan od glavnih izazova: neophodni su softverski alati koji mogu pouzdano da organizuju, filtriraju, normalizuju, statistički analiziraju i biološki interpretiraju rezultate na nivou gena, puteva i mreža.

U tom kontekstu, softverska podrška ima centralnu ulogu jer omogućava brzu i lako ponovljivu analizu velikih skupova podataka, kao i prepoznavanje obrazaca koji upućuju na potencijalno toksične supstance i mehanizme njihovog delovanja. Poseban napredak poslednjih godina donela je primena algoritama mašinskog učenja (engl. *Machine Learning*, ML) i veštačke inteligencije (engl. *Artificial Intelligence*, AI), koji pomažu u klasifikaciji profila, otkrivanju skrivenih struktura u podacima i izgradnji prediktivnih modela. Kada se ovi pristupi kombinuju sa dostupnim biološkim bazama i objedinjenim znanjem, otvara se prostor za prediktivnu toksikologiju i racionalnije donošenje odluka u proceni bezbednosti hemikalija i regulativi (Krämer i sar., 2014).

Jedna od najvažnijih polaznih tačaka u toksikogenomskim istraživanjima jeste analiza promena u ekspresiji gena. Promene u transkriptomu, posebno kada su povezane sa aktivacijom određenih signalnih puteva, mogu da nose „potpis“ specifičan za jedinjenje i da upućuju na farmakološke ili toksikološke efekte ispitivane supstance (Hamadeh i sar., 2002). Takvi potpisi omogućavaju identifikaciju biomarkera, ali i izgradnju modela koji povezuju molekulske događaje sa kasnijim fenotipskim promenama, što je osnova za modernu, mehanistički utemeljenu procenu rizika.

U praksi se koristi više komplementarnih tehnika za ispitivanje ekspresije gena. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (engl. *real-time quantitative PCR*, RT-qPCR) najčešće služi za validaciju ograničenog broja ciljnih gena i pruža visoku osetljivost i specifičnost u kvantifikaciji promene ekspresije. Nasuprot tome, analiza mikročipova (engl. *microarray*) omogućava paralelno praćenje velikog broja transkripata putem hibridizacije fluorescentno obeležene komplementarne DNK (kDNK) na probe fiksirane na čipu. Iako mikročipovi nude veću širinu i dobar pregled globalnih promena, RT-qPCR je po pravilu precizniji za merenje malih razlika u ekspresiji i češće se koristi kao

potvrdna metoda. Najsveobuhvatniji pristup danas predstavlja sekvenciranje RNK (RNA-Seq), koje omogućava kvantifikaciju praktično svih transkripata, detekciju novih transkripata, alternativnih izoformi i nekodirajućih molekula RNK, što je posebno korisno u toksikologiji za uočavanje ranih i suptilnih promena koje mogu izostati u tradicionalnim analizama (Alexander-Dann i sar., 2018). Ovi pristupi se mogu primeniti i u istraživanjima vezanim za KVB, gde je moguće izdvojiti molekulske potpise povezane sa izloženošću PFOS-u, PFOA-i i potencijalnim patogenetskim mehanizmima.

Pored eksperimentalnih platformi, ključan resurs u toksikogenomskim studijama predstavljaju javne baze podataka koje povezuju transkriptomske promene sa fenotipom, dozom, tkivom i hemijskom strukturom. Baze kao što su DrugMatrix (https://ntp.niehs.nih.gov/data/drugmatrix) i Open TG-GATEs (engl. *Toxicogenomics Project – Genomics Assisted Toxicity Evaluation System*; https://toxico.nibiohn.go.jp/english/index.html) omogućavaju upoređivanje profila ekspresije gena iz različitih eksperimenata i model sistema, što je korisno za povezivanje molekulskih promena sa toksičnim ishodima i za proveru konzistentnosti rezultata između studija. Dodatno, CMAP (engl. *Connectivity Map*; https://www.broadinstitute.org/connectivity-map-cmap) i LINCS (engl. *Library of Integrated Network-based Cellular Signatures*; https://commonfund.nih.gov/lincs) predstavljaju platforme orijentisane ka „potpisima“ ćelijskog odgovora na veliki broj supstanci, što omogućava otkrivanje sličnosti između profila delovanja različitih hemijskih jedinjenja, kao i pretpostavke o zajedničkim mehanizmima delovanja i potencijalnim intervencijama na nivou puteva i mreža (Lamb i sar., 2006; Musa i sar., 2017; Subramanian i sar., 2017).

Za funkcionalnu interpretaciju lista diferencijalno eksprimiranih gena (engl. *differentially expressed genes*, DEG) i transkriptomskih potpisa široko se koriste baze bioloških puteva i anotacija kao što su KEGG (engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; https://www.genome.jp/kegg/), Reactome (https://reactome.org/) i WikiPathways (https://www.wikipathways.org/). Ove baze omogućavaju „prevođenje“ promena na nivou pojedinačnih gena u promene na nivou puteva i procesa, što je važan korak ka mehanističkom tumačenju toksičnosti (Alexander-Dann i sar., 2018; Serra i sar., 2020). U kontekstu kardiovaskularne patogeneze, ovakvi resursi mogu pomoći da se prepoznaju putevi povezani sa oksidativnim stresom, inflamacijom i metabolizmom lipida, koji su često isticani kao relevantni mehanizmi u razvoju bolesti kao što su ateroskleroza i arterijska hipertenzija (Stapleton i sar., 2010). Na taj način, u slučaju izloženosti PFOS-u ili PFOA-i,

alati za analizu puteva omogućavaju da se izdvoje biološke celine koje povezuju molekulske promene sa potencijalnim funkcionalnim posledicama.

Posebno značajna za integraciju znanja iz više izvora je Komparativna baza toksikogenomskih podataka (engl. *Comparative Toxicogenomics Database*, CTD; https://ctdbase.org/) koja povezuje hemikalije, gene, fenotipove i bolesti u okviru koncepta „tetramera" hemikalija–gen–fenotip–bolest (engl. *Chemical–Gene–Phenotype–Disease [CGPD] tetramer*). Ovaj okvir omogućava da se početna izloženost nekoj supstanci dovede u vezu sa molekulskim i fenotipskim promenama koje mogu da vode ka nepovoljnim zdravstvenim ishodima (Davis i sar., 2023a). U praksi, CTD može biti polazište za formiranje ili podršku AOP okvira (engl. *Adverse Outcome Pathway*), gde se povezuju ključni molekulski događaji sa kasnijim štetnim ishodima, što je posebno važno za procenu rizika koja se zasniva na mehanističkom pristupu (Davis i sar., 2023b). Takođe, CTD olakšava kreiranje integrisanih blokova informacija koji povezuju supstance, gene, biološke procese i bolesti, što je korisno i za procenu efekata već poznatih, ali i novih jedinjenja i za predviđanje njihovih potencijalnih efekata (Stanic i sar., 2021).

Kada je potrebno sistematski proceniti da li su određeni biološki procesi ili putevi obogaćeni u posmatranom transkriptomskom odgovoru, često se koristi GSEA (engl. *Gene Set Enrichment Analysis*; https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp). Umesto da se analiziraju samo pojedinačni geni, GSEA se oslanja na unapred definisane skupove gena i identifikuje obrasce koji ukazuju na koordinisane promene unutar određenih procesa. Ovo može biti naročito korisno u studijama koje se bave sistemskim posledicama izlaganja, kao što su oksidativni stres, inflamacija ili poremećaji metabolizma lipida, koji se često povezuju sa oštećenjem vaskularne funkcije i povećanim rizikom od ateroskleroze (Alexander-Dann i sar., 2018). Pored toga, alati poput CMAP i LINCS mogu dopuniti ovakvu analizu tako što omogućavaju upoređivanje potpisa odgovora na PFOS ili PFOA-u sa potpisima drugih supstanci ili lekova, što može ukazati na slične mehanizme delovanja ili potencijalne suprotstavljene toksikološke profile (Koleti i sar., 2018).

Na kraju, važno je naglasiti da toksikogenomika ne podrazumeva samo opisivanje promena, već sve više teži predviđanju toksičnih ishoda. U tom cilju se primenjuju pristupi zasnovani na upotrebi AI/ML, uključujući neuronske mreže, QSAR (engl. *Quantitative Structure Activity Relationship*) modele, kao i savremene strategije kao što su analiza BMC-a, mreže koekspresije gena i „read-across" metode, koje omogućavaju zaključivanje o toksičnosti novih jedinjenja na osnovu sličnosti sa već proučenim supstancama. Ovi pristupi

se često povezuju sa specijalizovanim platformama i alatima kao što su OpenTox (https://opentox.net/), VegaHub QSAR (https://www.vegahub.eu/portfolio-item/vega-qsar/), Toxtree (https://toxtree.sourceforge. net/) i ToxCast (https://www.epa.gov/comptox-tools/toxicity-forecasting-toxcast), čime se grade prediktivni okviri koji mogu doprineti pouzdanijoj proceni rizika i boljem usmeravanju regulatornih i preventivnih mera (Singh i sar., 2023). Kombinovanjem visokoprotočnih podataka, objedinjenih baza znanja i napredne analitike, softverski alati postaju ne samo tehnička podrška, već i strateški element u razvoju bezbednijih hemikalija i smanjenju rizika po ljudsko zdravlje i životnu sredinu.

3. CILJEVI

Opšti cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje efekata kratkotrajnog izlaganja odabranim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e na funkcijske i transkriptomske odgovore makrovaskularnih endotelnih ćelija čoveka u uslovima *in vitro*, na modelu kontinuirane ćelijske linije EA.hy926, kao i kvantitativna procena njihovog potencijalnog rizika primenom integrisanog *in vitro–in silico* pristupa.

U skladu sa tim, definisani su sledeći specifični ciljevi:

- Ispitati efekte kratkotrajnog izlaganja odabranim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e na funkcijske odgovore EA.hy926 ćelija, uključujući vijabilnost ćelija, broj ćelija u apoptozi i nekrozi, ćelijski ciklus, migraciju ćelija, adheziju ćelija za proteine ECM-a, angiogenezu u uslovima *in vitro*, vezivanje monocita za endotelne ćelije, propustljivost monosloja endotelnih ćelija, kao i redoks status ćelija (ROS i NO). Takođe, analizirati promene u ekspresiji ključnih gena i proteina uključenih u inflamacijski odgovor i vezivanje monocita (ICAM-1, VCAM-1, E-selektin), angiogenezu (VEGFA, VEGFR-2, VE-kadherin, PECAM-1), funkciju endotela (ekspresija i fosforilacija eNOS-a), kao i integritet međućelijskih veza (okludin, ZO-1).

- Analizirati transkriptomske odgovore EA.hy926 ćelija nakon izlaganja odabranim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e kroz identifikaciju DEG-ova i funkcionalnu anotaciju molekulskih funkcija i bioloških procesa.

- Kvantitativno modelovati koncentraciono-zavisne transkriptomske odgovore EA.hy926 ćelija nakon izlaganja PFOS-u i PFOA-i primenom BMC pristupa i izvršiti njihovu translaciju u HED-ove korišćenjem PBTK modelovanja.

- Proceniti rizik od izloženosti PFOS-u i PFOA-i u opštim i profesionalno izloženim populacijama primenom metrike BER, uz identifikaciju najosetljivijih molekularnih indikatora rizika.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Hemikalije i antitela

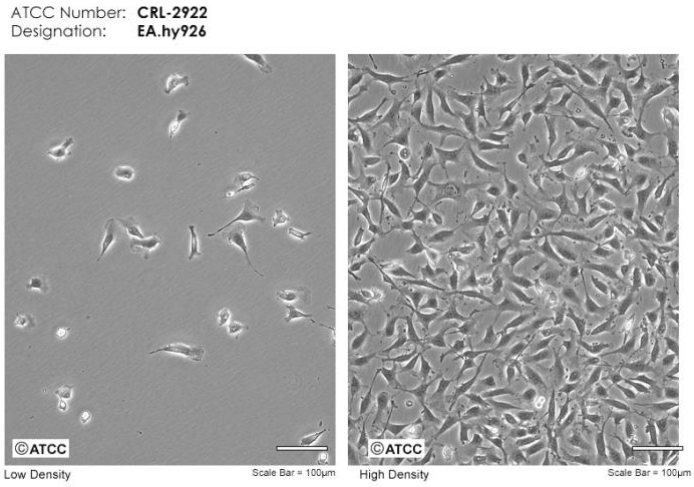
Perfluorooktansulfonat (kalijumova so, hemijska čistoća ≥98%), PFOA (hemijska čistoća 95%), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sa 4 mM L-glutaminom i 4,5 g/L glukoze, medijum RPMI-1640 sa 2 mM L-glutaminom, 25 mM puferom HEPES i 4,5 g/L glukoze, rastvor penicilina (10 000 IU/mL) i streptomicina (10 mg/mL), sulforodamin B (SRB), trihlorsirćetna kiselina (engl. *trichloroacetic acid*, TCA), dimetil-sulfoksid (DMSO), natrijumdodecil-sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS), natrijum-azid, natrijum-piruvat, natrijum-fluorid, natrijum-ortovanadat, etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), 0,25% rastvor tripsin-EDTA, albumin iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA), rastvor Hanks' Balanced Salt (HBSS), fluoresceinizotiocijanat (FITC)-dekstran (FD40, Mw 40 kDa), 2′,7′-dihlorodihidrofluorescein-diacetat (H_2DCFDA), Triton X-100, fibronektin iz goveđe plazme (1 mg/mL u 0,05 M Tris puferu, pH 7,5), (Z)-1-[N-(3-aminopropil)-N-(3-amoniopropil)amino]diazen-1-ium-1,2-diolat (DPTA NONOat), 0,4% rastvor boje tripan plavo (engl. *Trypan blue*) u 0,85% NaCl i inhibitori proteaza Roche c*O*mplete EDTA-free su nabavljeni od Sigma–Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Nemačka). Sterilni fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*, FBS), N-2-hidroksietilpiperazin-N-2-etansulfonska kiselina (HEPES), suplement HAT (5 mM natrijum-hipoksantin, 20 μM aminopterin, 0,8 mM timidin), kalcein AM, Pierce™ BCA Protein Assay Kit, SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard, reagens TRIzol™, reagens alamarBlue™ Cell Viability, propidijum-jodid (PI; hemijska čistoća ≥95%) i RNaza A su kupljeni od Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SAD). High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit za reverznu transkripciju i Power SYBR Green PCR Master Mix za RT-qPCR su nabavljeni od Applied Biosystems (Foster City, CA, SAD). Cultrex™ Reduced Growth Factor Basement Membrane Extract (BME), PathClear, je kupljen od R&D Systems/Bio-Techne (Minneapolis, MN, SAD). Annexin V-FITC je nabavljen od Elabscience (Houston, TX, SAD). VECTASHIELD® PLUS Antifade Mounting Medium with DAPI je kupljen od Vector Laboratories (Newark, CA, SAD), dok je 4-amino-5-metilamino-2′,7′-difluorofluorescein diacetat (DAF-FM DA) nabavljen od Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Primarno zečje poliklonsko antitelo protiv eNOS-a je nabavljeno od FineTest (Wuhan, Kina), dok je primarno zečje monoklonsko antitelo protiv fosfo-eNOS-a (specifično detektuje fosforilaciju eNOS-a na poziciji Ser1177) nabavljeno od Invitrogen–

Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SAD). Primarno zečje monoklonsko antitelo protiv gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) je kupljeno od Cell Signaling Technology (Danvers, MA, SAD), dok je primarno zečje monoklonsko antitelo protiv vinkulina nabavljeno od Abcam (Cambridge, UK). Primarno mišje monoklonsko antitelo protiv okludina je kupljeno od Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, SAD), a primarno kozje monoklonsko antitelo protiv ZO-1 od Abcam (Cambridge, UK). Sekundarna antitela vezana za peroksidazu rena (engl. *horse raddish peroxidase*, HRP), i to protiv mišjih, zečjih i kozjih primarnih antitela, kupljena su od Bio-Rad (Hercules, CA, SAD). Ostale hemikalije su bile analitičke čistoće.

4.2. Gajenje ćelija u kulturi

4.2.1. Ćelijska linija EA.hy926

Ćelijska linija EA.hy926 (ATCC® CRL-2922, www.atcc.org) je korišćena za ispitivanje uticaja kratkotrajnog (akutnog) izlaganja endotelnih ćelija čoveka odabranim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e u uslovima *in vitro*. Ova ćelijska linija je nastala fuzijom endotelnih ćelija vene pupčane vrpce čoveka (engl. *human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) sa klonom kontinuirane ćelijske linije adenokarcinoma pluća čoveka A549 rezistentnim na tioguanin nakon izlaganja polietilen-glikolu (Edgell i sar., 1983). EA.hy926 su po morfologiji epitelne, adherentne ćelije sa prosečnim vremenom dupliranja od približno 22–30 h koje pri dovoljnoj gustini formiraju kontinuirani ćelijski monosloj (slika 4.1).



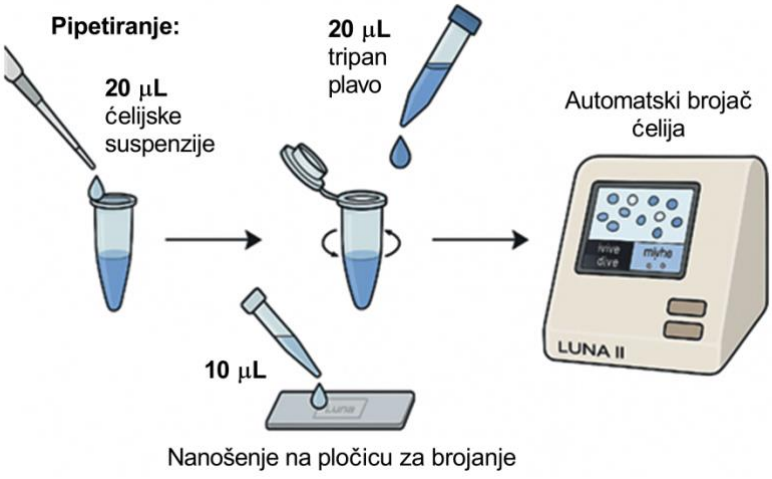
Slika 4.1. Izgled EA.hy926 ćelija pod invertnim svetlosnim mikroskopom. Preuzeto sa https://www.atcc.org/

EA.hy926 ćelije u citoplazmi poseduju Weibel-Palade-ove granule u kojima skladište vWF i P-selektin. Pored vWF, ove ćelije stabilno eksprimiraju i CD31 (odnosno PECAM-1) i eNOS, dok na gelastom matriksu koji je po svojoj prirodi ekstrakt bazalne membrane (npr. Matrigel™ ili Cultrex™) spontano grade cevaste strukture, što ih čini pogodnim modelom za proučavanje angiogeneze, endotelne disfunkcije i inflamacijskih procesa. EA.hy926 ćelije ispoljavaju brojne morfološke, fenotipske i funkcijske karakteristike tipične za makrovaskularne endotelne ćelije čoveka – eksprimiraju endotelne markere poput već pomenutih vWF i PECAM-1, kao i ICAM-1 i VCAM-1 (Edgell i sar., 1990; Ahn i sar., 1995). Koriste se za proučavanje vaskularne permeabilnosti, jer pokazuju sposobnost odgovora na različite faktore koji mogu uticati na propustljivost endotelnog monosloja. Otuda se ova ćelijska linija često koristi za ispitivanje mehanizama regulacije vaskularne permeabilnosti u različitim patološkim stanjima (Majewska i sar., 2021). EA.hy926 ćelije se takođe koriste u istraživanjima angiogeneze. Ispoljavaju markere angiogeneze kao što su VEGF i FGF-2 (Edgell i sar., 1983). EA.hy926 ćelije su po svim navedenim karakteristikama slične makrovaskularnim endotelnim ćelijama čoveka *in viv*o, ali se od njih razlikuju po sposobnosti da se neograničeno dele i proliferišu, što ih čini korisnim modelom za *in vitro* ispitivanja molekulskih i funkcijskih promena na endotelnim ćelijama koje se mogu javiti usled izlaganja različitim faktorima tokom dužeg vremenskog perioda.

EA.hy926 ćelije su gajene u sterilnim flaskovima površine 75 cm² kao monosloj u strogo kontrolisanim uslovima pri temperaturi od 37 °C i vlažnoj atmosferi sa 5% CO_2. U medijum DMEM je dodavano 0,11 g/L natrijum-piruvata, 1,5 g/L $NaHCO_3$, 1% smeše antibiotika penicilina i streptomicina i 10 mM HEPES-a, dok je kompletni medijum za gajenje ćelija pored navedenih komponenti sadržao i 10% FBS-a i 4% HAT-a. Zbog postepene degradacije L-glutamina u rastvoru, nakon dve nedelje je u kompletni medijum dodavan L-glutamin tako da finalna koncentracija u medijumu bude 2 mM. Medijum u kom su gajene ćelije je menjan svaka tri ili četiri dana prilikom pasažiranja. Kada su ćelije dostizale konfluentnost od 80-90%, medijum je uklanjan iz flaska, a ćelije su ispirane sa 10 mL fiziološkog rastvora puferisanog fosfatnim puferom (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS; 140 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,8 mM KH_2PO_4, pH 7,4) kako bi se uklonio ostatak medijuma i FBS-a koji sadrži inhibitore tripsina. U cilju odlepljivanja ćelija sa površine flaska dodavano je 2 mL rastvora 0,25% tripsin-EDTA, a ćelije su vraćane u inkubator 4 min na 37 °C. Nakon inkubacije, u flask je dodavano 2,5 puta više kompletnog

medijuma, 5 mL po flasku, kako bi se zaustavila enzimska aktivnost tripsina. Suspenzija ćelija je homogenizovana 10 puta provlačenjem kroz serološku pipetu, a zatim prebacivana u koničnu tubicu od 15 mL, nakon čega je centrifugirana 5 min na 400 ×g i sobnoj temperaturi. Po završetku centrifugiranja, supernatant je pažljivo uklanjan, a talog ćelija resuspendovan u 7 mL kompletnog medijuma provlačenjem kroz serološku pipetu oko 20 puta.

Broj ćelija u suspenziji određivan je testom sa bojom tripan plavo koji se zasniva na ulasku boje u nevijabilne ćelije kod kojih je narušen integritet ćelijske membrane, dok vijabilne ćelije ostaju neobojene. Rastvor boje tripan plavo (0,4%) je mešan sa ćelijskom suspenzijom u odnosu 1:1 (20 µL ćelijske suspenzije i 20 µL boje tripan plavo) kako bi se dobila suspenzija za brojanje, a zatim je alikvot od 10 µL bojene suspenzije nanošen na pločicu za brojanje. Ćelije su brojane pomoću automatskog brojača Luna-II™ (Logos Biosystems), koji daje podatke o ukupnom broju ćelija, broju živih i mrtvih ćelija u 1 mL suspenzije, kao i procenat vijabilnosti (slika 4.2).



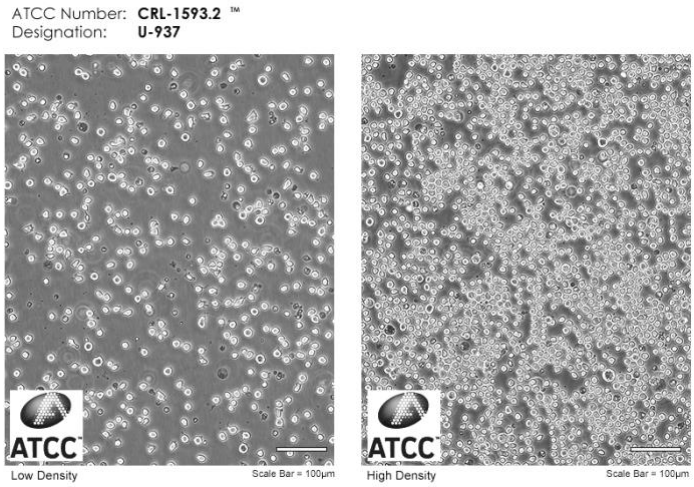
Slika 4.2. Šematski prikaz postupka bojenja ćelija bojom tripan plavo u cilju određivanja broja i vijabilnosti ćelija na automatskom brojaču Luna-II™.

Na osnovu očitanih vrednosti preračunata je zapremina ćelijske suspenzije i kompletnog medijuma koju je potrebno dodati u flask do narednog pasažiranja. Preko proporcije je određivan broj ćelija u zavisnosti od dana narednog pasažiranja, tj. u zavisnosti od toga da li su ćelije ostavljane u kulturi četiri dana (1,8 miliona ćelija po flasku) ili tri dana (2,8 miliona ćelija po flasku), tako što je željeni broj ćelija deljen sa brojem živih ćelija po 1 mL. Na osnovu ove proporcije izračunavana je zapremina ćelijske suspenzije u kojoj se nalazio odgovarajući broj ćelija i vršeno je dopunjavanje flaska kompletnim medijumom do

ukupne zapremine od 27 mL. Zapremine ćelijske suspenzije sa odgovarajućim brojem ćelija, kao i zapremine kompletnog medijuma koje su bile potrebne za zasejavanje ćelija za pojedinačne eksperimente, o čemu će biti reči u narednim poglavljima, izračunavane su na isti način.

4.2.2. Ćelijska linija U937

Promonocitna ćelijska linija U937 (ATCC® CRL-1593.2, www.atcc.org) je izolovana 1977. godine iz difuznog histiocitnog limfoma periferne krvi 37-godišnjeg muškarca. Ova ćelijska linija se već gotovo pola veka uspešno koristi za proučavanje humanih monocita i makrofaga. U937 ćelije rastu u suspenziji kao okrugli blastovi (slika 4.3) sa prosečnim vremenom dupliranja od približno 20–24 h, a pod uticajem odgovarajućih stimulusa (npr. forbol-12-miristat-13-acetat, 1α,25-dihidroksivitamin D_3) mogu se diferencirati u makrofage ili dendritske ćelije u zavisnosti od uslova u kulturi, što ih čini korisnim eksperimentalnim modelom za različite studije koje imaju za cilj ispitivanje imunskog odgovora. Široko se koriste u imunologiji, toksikologiji i studijama koje ispituju signalne puteve vezane za stres, apoptozu i inflamaciju. Zbog toga što ćelijska linija U937 poseduje brojne karakteristike monocita čoveka često se koristi u ispitivanju mehanizama koji su uključeni u vezivanje monocita za endotel krvnih sudova (Chanput i sar., 2015).



Slika 4.3. Izgled U937 ćelija pod invertnim svetlosnim mikroskopom.
Preuzeto sa https://www.atcc.org/

U937 ćelije su gajene u kontrolisanim uslovima, pri temperaturi od 37 °C i vlažnoj atmosferi sa 5% CO_2, u medijumu RPMI-1640 sa 4,5 g/L glukoze i dodatim sledećim

komponentama: 10% FBS-a koji je inaktivisan zagrevanjem na 56 °C u trajanju od 30 min, 1% rastvor antibiotika penicilina i streptomicina, 2,2 g/L $NaHCO_3$ i 0,11 g/L natrijum-piruvata. Ćelije su pasažirane svaka tri ili četiri dana, kada su dostizale gustinu od 1,5 – 2 miliona ćelija po 1 mL. Ćelijska suspenzija je homogenizovana provlačenjem kroz pipetu 20-ak puta, nakon čega je broj ćelija u suspenziji određivan kao što je opisano u poglavlju 4.2.1. Odgovarajuća zapremina suspenzije je nakon brojanja centrifugirana 6 min na 300 ×g na sobnoj temperaturi, nakon čega je supernatant pažljivo uklanjan, a talog ćelija resuspendovan u 10 mL kompletnog medijuma. Deo ćelija je potom korišćen za potrebe eksperimenta, a deo je vraćan u flask u gustini od oko 200 000 ćelija po mL (u ukupnoj zapremini od 30 mL) u cilju dalje propagacije ćelijske kulture.

4.3. Izlaganje EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu i perfluorooktanskoj kiselini

U cilju ispitivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja endotelnih ćelija odabranim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e u uslovima *in vitro* EA.hy926 ćelije su gajene u flaskovima u standardnim uslovima na način opisan u poglavlju 4.2.1, a potom su prilikom pasažiranja zasejavane u odgovarajuće ploče za ćelijske kulture ili Petri posude. Nakon 24 h, ukoliko nije naznačeno drugačije, u medijum su dodavani odgovarajući tretmani, prema protokolu opisanom u narednim pasusima.

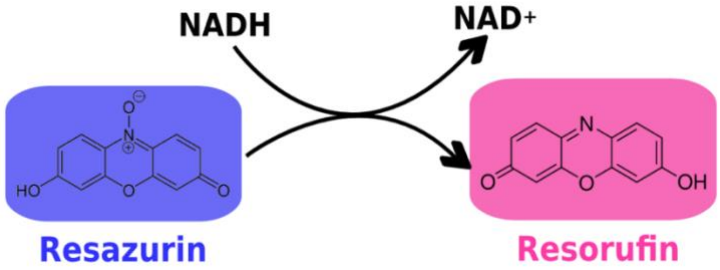
Za potrebe izlaganja EA.hy926 ćelija PFOS-u i PFOA-i pripremljeni su radni rastvori ovih supstanci kroz seriju razblaženja počevši od osnovnog rastvora koncentracije 2×10^{-1} M (200 mM). Osnovni rastvori su dobijeni rastvaranjem 15 mg PFOS-a (Mw = 538,22 g/mol) u 139,35 µL DMSO-a, odnosno 15 mg PFOA-e (Mw = 414,07 g/mol) u 181,13 µL DMSO-a. Sukcesivnim razblaživanjem osnovnog rastvora PFOS-a, odnosno PFOA-e u DMSO-u dobijena su tri radna rastvora: 2×10^{-1} M (200 mM), 2×10^{-2} M (20 mM) i 2×10^{-3} M (2 mM) PFOS, odnosno PFOA. Ovi radni rastvori su korišćeni za izlaganje ćelijskih kultura razblaživanjem 2000 puta, pri čemu su dobijene sledeće finalne koncentracije PFOS-a i PFOA-e u medijumu: iz 200 mM → 100 µM, iz 20 mM → 10 µM, iz 2 mM → 1 µM. Koncentracija DMSO-a u kontroli bila je ista za sve tretmane – 0,05%.

EA.hy926 ćelije su izlagane gore navedenim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a, odnosno PFOA-e u trajanju od 15 min do 48 h, u zavisnosti od potreba eksperimenta. Treba napomenuti da su koncentracije PFOS-a i PFOA-e koje su korišćene u

ovom doktorskom projektu uglavnom iznad koncentracija kojima je čovek rutinski izložen i koje se mogu izmeriti u telesnim tečnostima većine ljudi (Ingelido i sar., 2025). Međutim, visoke koncentracije ovih supstanci se mogu detektovati u serumu ljudi u specifičnim okolnostima, kao što su akutna profesionalna izloženost u procesima proizvodnje PFAS (Wang i sar., 2012), kod vatrogasaca usled upotrebe pene za gašenje požara i radnika na aerodromima (Christensen i Calkins, 2023), kod profesionalnih vojnika (Petersen i sar., 2025), pri upotrebi visoko kontaminirane hrane i vode za piće u pojedinim regionima (Zhou i sar., 2014) i dr.

4.4. Ispitivanje vijabilnosti EA.hy926 ćelija testom sa bojom alamarBlue™

U cilju ispitivanja uticaja PFOS-a i PFOA-e na metaboličku aktivnost, odnosno vijabilnost EA.hy926 ćelija korišćen je test sa bojom alamarBlue™. Ovaj test se široko koristi zbog svoje jednostavnosti, niske toksičnosti i neinvazivnosti. Zasniva se na prirodnoj sposobnosti živih ćelija da pretvore resazurin u fluorescentni molekul resorufin. Resazurin je u svom oksidovanom obliku nefluorescentno, netoksično jedinjenje plave boje koje se u metabolički aktivnim, živim ćelijama redukuje do resorufina, jedinjenja ružičastocrvene boje koje se odlikuje visokim intenzitetom fluorescencije (slika 4.4).



Slika 4.4. Reakcija redukcije resazurina u resorufin koja se dešava u metabolički aktivnim ćelijama.

Proces redukcije je direktno povezan sa ćelijskim metabolizmom i, samim tim, vijabilnošću ćelija (Rampersad, 2012). S obzirom da u reakciji dolazi do promene kako fluorescencije, tako i boje novonastalog jedinjenja, merenje se može sprovesti pomoću fluorimetra (veća osetljivost) ili spektrofotometra (manja osetljivost), pri čemu je intenzitet signala proporcionalan broju metabolički aktivnih ćelija (Rampersad, 2012).

U cilju utvrđivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e na metaboličku aktivnost/vijabilnost ćelija, za svaki tretman i kontrolu zasejavano je po 15 000 ćelija u 150 µL kompletnog medijuma u osam bunarića ploče od 96 bunarića. Nakon 24 h, na postojeći medijum u odgovarajućim bunarićima je dodavano po 50 µL 500 puta razblaženih radnih rastvora PFOS-a, odnosno PFOA-e i kontrole (DMSO) kako bi se dobile odgovarajuće finalne koncentracije tretmana (razblaženje 2000 puta). Na taj način je ukupna zapremina po bunariću iznosila 200 µL. Ploča je potom ostavljana u inkubator na 37 °C. Po isteku 48 h, medijum sa tretmanima je pažljivo uklanjan multikanalnom pipetom, nakon čega je u svaki bunarić dodavano po 70 µL 10% rastvora boje alamarBlue™ koji je pripreman u kompletnom medijumu. Pored toga, u osam bunarića bez ćelija je dodavana ista zapremina 10% rastvora boje alamarBlue™ u kompletnom medijumu kako bi se izmerio fluorescentni signal koji potiče od same boje (pozadinski signal). Ćelije su zatim inkubirane 2 h u mraku na 37 °C, nakon čega su rezultujuće fluorescencije merene na fluorimetru Thermo Labsystems Fluoroskan Ascent sa prethodno podešenim talasnim dužinama: λex = 540 nm i λem = 590 nm. Fluorescentni signal poreklom od boje alamarBlue™ (bez ćelija) oduziman je od vrednosti dobijenih u svim tretiranim bunarićima (sa ćelijama). Rezultati su kvantitativno određeni tako što je za svaki tretman i kontrolu izračunata srednja vrednost fluorescentnog signala. Vijabilnost EA.hy926 ćelija u tretiranim grupama izražena je kao procenat u odnosu na vijabilnost ćelija u kontrolnoj grupi, čija je vrednost predstavljena kao 100%.

4.5. Određivanje udela EA.hy926 ćelija u apoptozi i nekrozi pomoću aneksina V i propidijum-jodida na protočnom citometru

U cilju ispitivanja uticaja PFOS-a i PFOA-e na broj EA.hy926 ćelija koje se nalaze u apoptozi i nekrozi korišćen je test sa aneksinom V-FITC i PI-om na protočnom citometru. Metoda istovremenog bojenja aneksinom V i PI-om omogućava preciznu identifikaciju i kvantifikaciju ćelija u fazama apoptoze i nekroze. U ranim fazama programirane ćelijske smrti (apoptoze) fosfatidilserin (engl. *phosphatidylserine*, PS) se aktivno transportuje sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane, gde ga aneksin V-FITC specifično vezuje, dok je ćelijska membrana još uvek neoštećena i neprobojna za PI. U kasnoj apoptozi ili sekundarnoj nekrozi dolazi do gubitka integriteta ćelijske membrane, PI ulazi u ćeliju, vezuje se za DNK i obeležava je dodatnom crvenom fluorescencijom. Primarno nekrotične

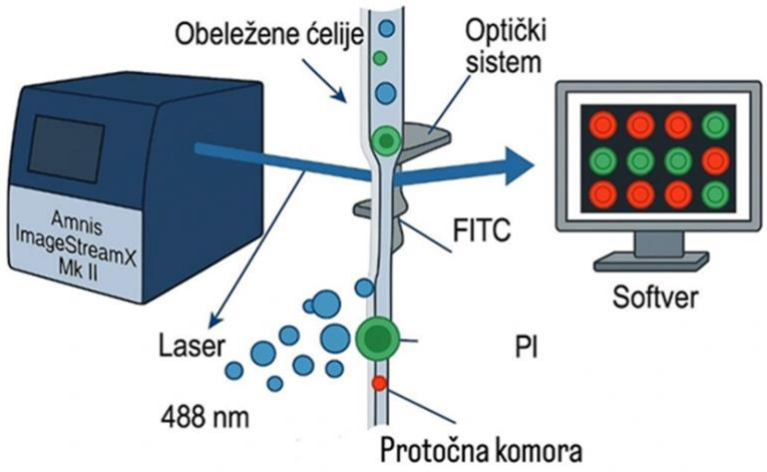
ćelije, čija je membrana od početka kompromitovana, ne izlažu značajno PS na površini ćelijske membrane, ostaju negativne za FITC, ali pozitivne za PI, dok su žive ćelije obostrano negativne. Merenje fluorescentnog signala pomoću protočnog citometra omogućava kvantifikaciju broja ćelija koje se nalaze u ranim i kasnim fazama apoptoze, kao i broja ćelija u nekrozi, te se na taj način može precizno pratiti dinamika ćelijske smrti u ispitivanom uzorku.

U cilju utvrđivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e na broj ćelija koje se nalaze u apoptozi i nekrozi, za svaki tretman i kontrolu zasejavano je 700 000 ćelija u 2 mL kompletnog medijuma po jednom bunariću ploče sa šest bunarića. Nakon 24 h, medijum iz bunarića je pažljivo uklanjan, nakon čega je dodavano po 3 mL kompletnog medijuma sa razblaženim radnim rastvorima PFOS-a, odnosno PFOA-e i kontrole (DMSO). Ploča je potom ostavljana u inkubator na 37 °C. Po isteku 48 h, medijum je sakupljan u konične tubice od 15 mL, a ćelije su ispirane sa po 2 mL PBS-a po bunariću. Nakon uklanjanja PBS-a, dodavano je 0,5 mL 0,25% rastvora tripsin-EDTA po bunariću, a ćelije su potom vraćane u inkubator 4 min na 37 °C. Nakon inkubacije, u bunariće je dodavano po 1,5 mL prethodno sakupljenog kompletnog medijuma sa odgovarajućim tretmanima. Suspenzija ćelija je homogenizovana 10 puta provlačenjem kroz nastavak pipete od 1000 µL, a zatim prebacivana u koničnu tubicu od 15 mL, nakon čega je centrifugirana 5 min na 400 ×g i sobnoj temperaturi. Po završetku centrifugiranja, supernatant je pažljivo uklanjan, a talog ćelija je resuspendovan u 3 mL hladnog PBS-a, nakon čega su ćelije ponovo centrifugirane pri istim uslovima, kako bi se uklonili tragovi medijuma. Supernatant je pažljivo uklanjan, a talog ćelija je resuspendovan u 55 µL pufera koji je sadržao 2,5 µL rastvora aneksin-V FITC i 2,5 µL rastvora PI-a koncentracije 100 µg/mL (engl. *Annexin V Binding Buffer*). Suspenzija ćelija je homogenizovana provlačenjem kroz nastavak pipete od 200 µL 20-ak puta i kratko promešana na vortex mešalici (najmanja brzina), a potom inkubirana 20 min u mraku na sobnoj temperaturi. Po završenoj inkubaciji, u svaki uzorak je dodavano po 150 µL Annexin V Binding Buffer-a. Dobijena suspenzija je homogenizovana provlačenjem kroz nastavak pipete od 200 µL 20-ak puta, a zatim filtrirana kroz najlonsku mrežicu u tubice od 1,5 mL koje su do analize na protočnom citometru čuvane na ledu i zaštićene od svetlosti.

Za analizu ćelijskih populacija korišćen je uređaj Amnis® ImageStream®X Mk II Imaging Flow Cytometry (IFC) (Luminex Corporation), u kombinaciji sa softverom INSPIRE™ ImageStream®X System Software (Luminex Corporation). Parametri merenja

su bili podešeni tako da omoguće detekciju pojedinačnih ćelija, sa ciljem obrade približno 25 000 ćelija po uzorku. Za ekscitaciju fluorescentnih markera korišćen je plavi laser (λex = 488 nm), jačine 100 mW, pri čemu je signal poreklom od FITC-a (aneksin V) očitavan na kanalu 2, a signal poreklom od PI-a na kanalu 5.

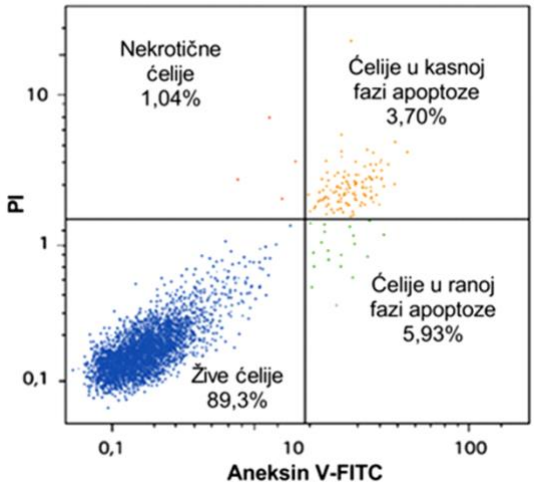
Sistem Amnis® IFC integriše dva komplementarna pristupa u jednom uređaju: (i) funkcionalnost klasične protočne citometrije, koja omogućava brzu obradu velikog broja ćelija uz visok nivo statističke pouzdanosti, ali bez informacije o subćelijskoj lokalizaciji signala, i (ii) optičku mikroskopiju, koja pruža detaljne informacije o morfologiji ćelija, ali uz ograničenje u brzini analize (slika 4.5). Kombinovanjem ovih tehnologija, Amnis® ImageStream®X Mk II IFC omogućava istovremenu kvantitativnu analizu i vizuelnu validaciju dobijenih rezultata, čime se značajno povećava preciznost u identifikaciji ćelijskih stanja. Ovakav pristup omogućava tačno definisanje regiona od interesa i doprinosi formiranju pouzdanih i argumentovanih zaključaka u okviru eksperimentalne analize.



Slika 4.5. Princip rada Amnis® ImageStreamX Mk II – kombinovana protočna citometrija i mikroskopija u analizi obeleženih ćelija.

Analiza podataka prikupljenih protočnom citometrijom sprovedena je pomoću softverskog paketa IDEAS® 6.2 Image Data Exploration and Analysis Software (Luminex Corporation). Za grafički prikaz rezultata korišćen je dvojno rasuti dijagram (engl. *dot-plot*), na kome su ćelije raspoređene u okviru četiri jasno definisana kvadranta, u zavisnosti od intenziteta fluorescentnog signala detektovanog za fluorofore FITC i PI (slika 4.6). Distribucija ćelija po kvadrantima omogućava razlikovanje sledećih populacija:

- Donji levi kvadrant: žive ćelije (negativne za aneksin V-FITC, negativne za PI)
- Donji desni kvadrant: ćelije u ranoj apoptozi (pozitivne za aneksin V-FITC, negativne za PI)
- Gornji desni kvadrant: ćelije u kasnoj apoptozi (pozitivne za oba markera – aneksin V-FITC i PI)
- Gornji levi kvadrant: nekrotične ćelije (negativne za aneksin V-FITC, pozitivne za PI)



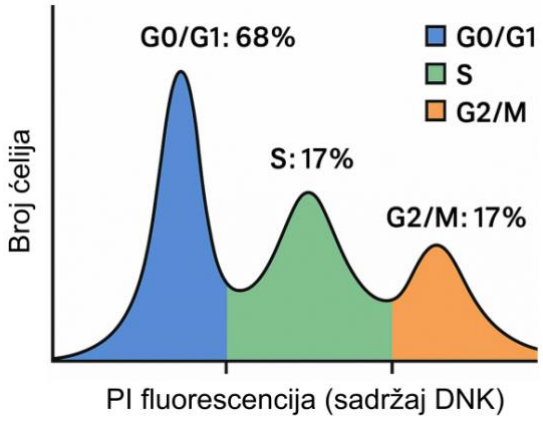
Slika 4.6. Primer dvojno rasutog dijagrama na protočnom citometru nakon obeležavanja ćelija aneksinom V-FITC i propidijum-jodidom – distribucija ćelija po kvadrantima.

Rezultati su prikazani kao procenat ćelija u ranoj apoptozi, kasnoj apoptozi i ćelija u nekrozi u odnosu na kontrolnu grupu.

4.6. Određivanje udela EA.hy926 ćelija u fazama ćelijskog ciklusa pomoću propidijum-jodida na protočnom citometru

U cilju ispitivanja uticaja PFOS-a i PFOA-e na progresiju EA.hy926 ćelija kroz ćelijski ciklus korišćena je metoda kvantifikacije faza ćelijskog ciklusa koja se zasniva na bojenju ukupnog sadržaja DNK pomoću PI-a nakon fiksacije i permeabilizacije ćelija, a potom i analize tako pripremljenih uzoraka na protočnom citometru. PI je fluorescentna interkališuća boja koja se vezuje za molekul DNK. Intenzitet fluorescencije poreklom od PI-a direktno je proporcionalan količini DNK u svakoj ćeliji. Pre bojenja, uzorak se tretira RNazom da bi se uklonila RNK i sprečilo lažno precenjivanje signala. Na protočnom citometru, lasersko pobuđivanje izaziva crvenu fluorescenciju proporcionalnu sadržaju

DNK. Dobijeni histogram fluorescencije prikazuje tri glavne populacije: ćelije u fazi G0/G1 (2N DNK), ćelije u fazi S (2N–4N) i ćelije u fazi G2/M (4N DNK) (slika 4.7). Ovakva vizualizacija omogućava brzu procenu proliferativnog statusa, praćenje efekata različitih tretmana na dinamiku ćelijskog ciklusa i otkrivanje eventualnih sub-G1 pikova koji ukazuju na apoptotsku fragmentaciju DNK.



Slika 4.7. Primer histogramskog dijagrama na protočnom citometru nakon obeležavanja ćelija propidijum-jodidom – distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa.

U cilju utvrđivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e na propagaciju ćelija kroz faze ćelijskog ciklusa, za svaki tretman i kontrolu zasejavano je 700 000 ćelija u 2 mL kompletnog medijuma po jednom bunariću ploče sa šest bunarića. Nakon 24 h, medijum iz bunarića je pažljivo uklanjan, nakon čega je dodavano po 3 mL kompletnog medijuma sa razblaženim radnim rastvorima PFOS-a, odnosno PFOA-e i kontrole (DMSO). Ploča je potom ostavljana u inkubator na 37 °C. Po isteku 48 h, medijum je sakupljan u konične tubice od 15 mL, a ćelije su ispirane sa po 2 mL PBS-a po bunariću. Nakon uklanjanja PBS-a, dodavano je 0,5 mL 0,25% rastvora tripsin-EDTA po bunariću, a ćelije su potom vraćane u inkubator 4 min na 37 °C. Nakon inkubacije, u bunariće je dodavano po 1,5 mL prethodno sakupljenog kompletnog medijuma sa odgovarajućim tretmanima. Suspenzija ćelija je homogenizovana 10 puta provlačenjem kroz nastavak pipete od 1000 µL, a zatim prebacivana u koničnu tubicu od 15 mL, nakon čega je centrifugirana 5 min na 400 ×g i sobnoj temperaturi. Po završetku centrifugiranja, konične tubice su prebacivane na led, supernatant je pažljivo uklanjan, a talog ćelija je resuspendovan u 5 mL hladnog PBS-a po epruveti, nakon čega su ćelije ponovo centrifugirane pri istim uslovima, kako bi se uklonili tragovi medijuma. Supernatant je pažljivo uklanjan, a talog ćelija je resuspendovan u 0,5 mL hladnog PBS-a.

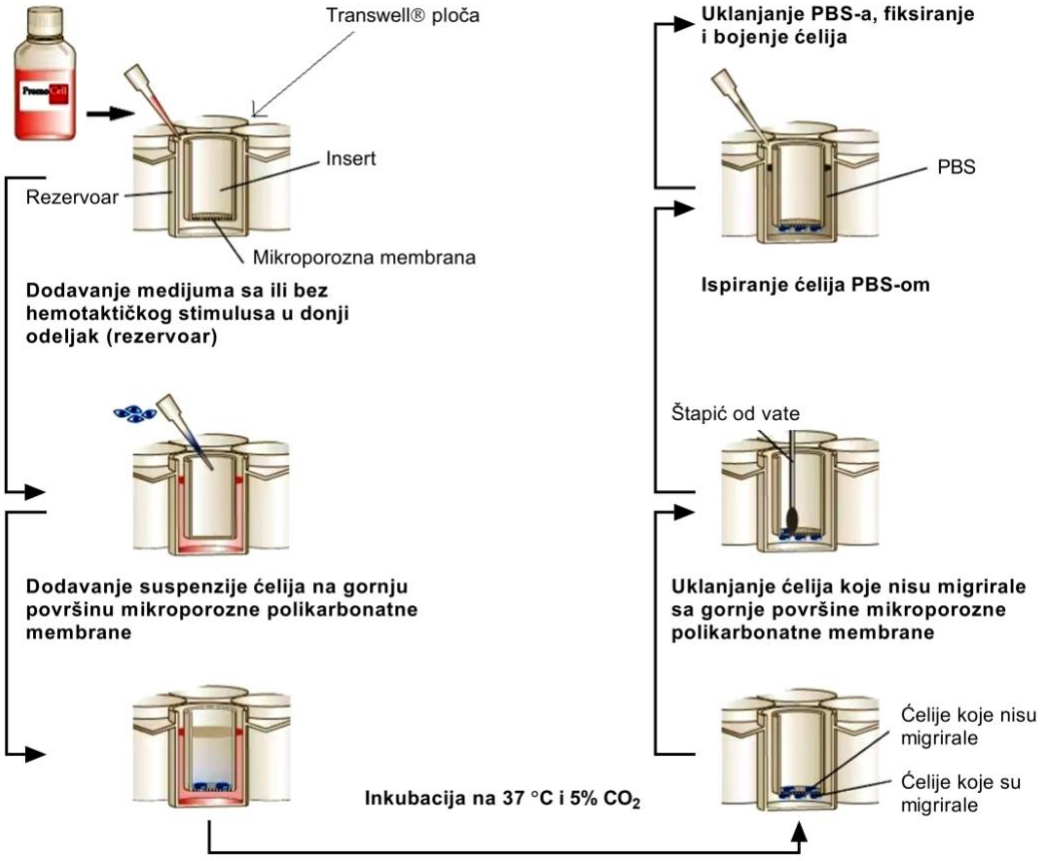
Suspenzija ćelija je homogenizovana provlačenjem kroz nastavak pipete od 200 µL 20-ak puta i kratko promešana na vortex mešalici (najmanja brzina), a potom metodom kap po kap prenošena u koničnu tubicu od 15 mL u kojoj se nalazilo 4,5 mL hladnog 70% etanola, uz neprekidno mešanje na vortex mešalici pri maloj brzini kako bi se izbeglo grupisanje ćelija. Tubice su zatvorene, zaštićene parafilmom i ostavljene na 4 °C tokom 24 h kako bi se ćelije fiksirale. Narednog dana, konične tubice sa fiksiranim ćelijama su centrifugirane 5 min na 900 ×g. Supernatant je pažljivo uklanjan, a fiksirane ćelije su ispirane sa 5 mL hladnog PBS-a po tubici i ponovo centrifugirane pri istim uslovima. Nakon centrifugiranja, supernatant je pažljivo uklanjan, a talog ćelija je resuspendovan u 150 µL rastvora PI-a koji je sadržao 0,01 mg/mL PI-a, 0,1% v/v deterdženta Triton X-100 i 0,1 mg/mL RNaze A u PBS-u. Uzorci su potom inkubirani 20 min u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, suspenzija ćelija je filtrirana kroz najlonsku mrežicu u tubice od 1,5 mL koje su do analize na protočnom citometru čuvane na ledu i zaštićene od svetlosti.

Za analizu faza ćelijskog ciklusa korišćen je uređaj Amnis® ImageStream®X Mk II IFC i program INSPIRE™ ImageStream®X System Software. Parametri merenja su bili podešeni tako da omoguće detekciju pojedinačnih ćelija, sa ciljem obrade približno 15 000 ćelija po uzorku. Za ekscitaciju je korišćen plavi laser (λex = 488 nm), jačine 5 mW, pri čemu je signal poreklom od PI-a očitavan na kanalu 5.

Obrada dobijenih podataka urađena je u programu IDEAS® 6.2 Image Data Exploration and Analysis Software korišćenjem histogramskog prikaza sa linearno postavljenom x-osom na kojoj je prikazan intenzitet fluorescentnog signala poreklom od PI-a, dok je na y-osi prikazana normalizovana frekvenca ćelija koje se odlikuju određenim nivoom fluorescentnog signala poreklom od PI-a. Definisanjem dva jasno razgraničena regiona na histogramu su identifikovane ćelije u određenim fazama ćelijskog ciklusa – region koji obuhvata prvi pik sa nižim nivoom fluorescencije (levo) sadrži ćelije koje se nalaze u fazi G0/G1 ćelijskog ciklusa, dok region koji obuhvata drugi pik sa dvostruko višim nivoom fluorescencije (desno), što odgovara dvostruko višem sadržaju DNK, sadrži ćelije koje se nalaze u fazi G2/M ćelijskog ciklusa. Između ova dva regiona su identifikovane ćelije u fazi S. Rezultati su prikazani kao procenat ćelija u određenoj fazi ćelijskog ciklusa, odnosno kao procenat ćelija u fazama G0/G1, S i G2/M.

4.7. Ispitivanje migracije EA.hy926 ćelija u Transwell® sistemu

Transwell® sistem predstavlja modifikovanu Boyden-ovu komoru i standardizovanu metodu za ispitivanje migracije ćelija u uslovima *in vitro*. Sistem se sastoji od dva odeljka (komore) – gornjeg (tzv. insert) i donjeg (tzv. rezervoar), koji su odvojeni mikroporoznom polikarbonatnom membranom sa definisanim prečnikom pora (najčešće 8,0 μm za migraciju somatskih ćelija). Ćelije se postavljaju u gornji odeljak, na površinu polikarbonatne membrane, dok se u donji odeljak dodaje medijum koji može, ali ne mora sadržavati hemotaktički stimulus. Tokom inkubacije, ćelije koje poseduju potencijal za migraciju prolaze kroz poroznu membranu ka donjem odeljku. Nakon inkubacije, ćelije koje su migrirale se kvantifikuju pomoću bojenja, mikroskopskog prebrojavanja ili spektrofotometrijskih metoda (slika 4.8). Ova tehnika omogućava procenu bazalne migracije, kao i migracije indukovane hemotaktičkim stimulusima, i često se koristi u istraživanjima ćelijskog odgovora na različite supstance ili uslove u mikrookruženju.



Slika 4.8. Šematski prikaz ispitivanja migracije ćelija u Transwell® sistemu.

U cilju utvrđivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e na migraciju ćelija, za svaki tretman i

kontrolu zasejavano je 600 000 ćelija u 2 mL kompletnog medijuma po jednom bunariću ploče sa šest bunarića. Nakon 24 h, medijum iz bunarića je pažljivo uklanjan, nakon čega je dodavano po 2,5 mL kompletnog medijuma sa razblaženim radnim rastvorima PFOS-a, odnosno PFOA-e i kontrole (DMSO). Ploča je potom ostavljana u inkubator na 37 °C. Po isteku 48 h, medijum je pažljivo uklanjan, ćelije su ispirane sa 3 mL PBS-a po bunariću, a zatim je dodavano 0,5 mL tripsina po bunariću kako bi se ćelije odlepile. Ploča je ostavljana u inkubator na 4 min. Nakon inkubacije, dodavano je 1,5 mL kompletnog medijuma po bunariću da bi se inhibirao tripsin koji je razgradio proteine ECM-a, sadržaj je dobro izmešan provlačenjem kroz pipetu 10 puta i prenošen u konične tubice zapremine 15 mL. Ćelijska suspenzija je centrifugirana 5 min na 400 ×g, na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja, supernatant je pažljivo uklanjan, a ćelije su ispirane sa po 3 mL PBS-a i ponovo centrifugirane pri istim uslovima, kako bi se uklonili ostaci seruma. Supernatant je pažljivo uklanjan, a talog ćelija je resuspendovan u 1 mL medijuma bez seruma. Ćelije su nakon toga brojane, a zatim je po 200 000 ćelija u 200 µL medijuma bez seruma prebacivano u novi set tubica od 1,5 mL. U suspenziju ćelija je potom dodavano po 200 µL odgovarajućih tretmana pripremljenih u DMEM-u bez seruma (razblaženje 1000 puta), tako da je finalno razblaženje iznosilo 2000 puta. Suspenzija ćelija sa odgovarajućim tretmanima je homogenizovana provlačenjem kroz nastavak pipete od 200 µL 20 puta, a zatim je iz svake tubice prebacivano po 100 µL ovako pripremljene ćelijske suspenzije (50 000 ćelija) na površinu mikroporozne polikarbonatne membrane gornjeg odeljka Transwell® sistema (prečnik pora 8,0 µm, prečnik inserta 6,5 mm). Za svaki tretman i kontrolu ćelije su zasejavane u po dva inserta Transwell® ploče, ukupno osam inserata. Kako bi se ćelije zalepile za membranu, Transwell® ploča sa ćelijama je ostavljana 30 min u inkubatoru na 37 °C. Po isteku 30 min, u donje odeljke Transwell® ploče (ukupno osam) dodavano je po 0,6 mL kompletnog medijuma koji je delovao kao hemotaktički stimulus za ćelije u gornjem odeljku. Ćelije su potom ostavljane 5 h u inkubator na 37 °C.

Nakon toga je medijum pažljivo uklanjan, a zatim su gornji i donji odeljci Transwell® ploče ispirani dva puta sa 0,5 mL PBS-a po odeljku. Ćelije koje nisu migrirale su nakon ispiranja kružnim pokretima mehanički uklanjane sa gornje površine polikarbonatne membrane inserta pomoću plastičnog štapića sa vatom, a zatim su gornji i donji odeljci ispirani dva puta na gore naveden način. Ćelije su potom fiksirane dodavanjem po 0,5 mL 4% rastvora paraformaldehida (PFA) u oba odeljka, 20 min na sobnoj temperaturi. Nakon fiksiranja ćelija, PFA je pažljivo uklanjan, a zatim su gornji i donji odeljci

Transwell® ploče ispirani dva puta sa 0,5 mL PBS-a po odeljku. Nakon poslednjeg ispiranja, PBS je pažljivo uklanjan, a polikarbonatne membrane su isecane pomoću skalpela i stavljane na predmetne mikroskopske pločice, vodeći računa da donja strana membrane bude okrenuta ka gore. Preko polikarbonatnih membrana je u tankom sloju nanošen rastvor za očuvanje fluorescencije VECTASHIELD® PLUS Antifade Mounting Medium koji sadrži fluorescentnu boju DAPI. Membrane su potom prepokrivane pokrovnim stakalcetom, a spoljne ivice predmetne pločice i pokrovnog stakalceta su slepljene providnim lakom za nokte, kako bi se sprečilo isparavanje rastvora za očuvanje fluorescencije i isušivanje membrane. Tako pripremljene mikroskopske pločice su do pravljenja fotografija ostavljane na 4 °C, zaštićene od svetla. Ćelije koje su migrirale kroz mikroporoznu polikarbonatnu membranu Transwell® sistema su fotografisane pod fluorescentnim mikroskopom Zeiss Axio Imager.A2 (DAPI filter, 250 ms ekspozicija, gain factor 6 ili 7, 10x objektiv, JPEG format slika). Za svaku membranu je napravljeno 10–15 fotografija nasumično odabranih vidnih polja. Kvantifikacija migracije je urađena korišćenjem programa NIH Image J (https://imagej.nih.gov/) na taj način što su na fotografijama sa fluorescentnog mikroskopa ručno izbrojana jedra ćelija obojena fluorescentnom bojom DAPI. Za svaki tretman i kontrolu izračunata je srednja vrednost broja ćelija koje su migrirale kroz membranu, a potom je migracija izražena kao procenat EA.hy926 ćelija koje su migrirale u odnosu na kontrolu, čija je vrednost predstavljena kao 100%.

4.8. Ispitivanje adhezije EA.hy926 ćelija za ekstracelularni matriks

Praćenje adhezije ćelija za proteine ECM-a predstavlja važnu *in vitro* metodu za ispitivanje interakcije ćelija sa supstratom, što je ključno za procese kao što su migracija, angiogeneza, diferencijacija i preživljavanje. U ovoj metodi, površina ploče za ćelijske kulture se prethodno oblaže određenim proteinima ECM-a, poput laminina, želatina, fibronektina ili kolagena, nakon čega se ćelije nanose na obloženu podlogu i inkubiraju određeno vreme. Nakon inkubacije, nevezane ćelije se uklanjaju ispiranjem, dok se vezane ćelije kvantifikuju putem bojenja, mikroskopskog prebrojavanja ili kolorimetrijskih metoda. Ova metoda omogućava procenu adhezivnog potencijala ćelija i efekata različitih supstanci ili uslova u mikrookruženju na sposobnost vezivanja ćelija za specifične komponente matriksa.

Dan pre izvođenja eksperimenta, osam bunarića ploče sa dvanaest bunarića presvučeno je slojem fibronektina (5% fibronektin u čistom DMEM-u) na taj način što je po jednom bunariću dodavano 0,5 mL ovako pripremljenog rastvora. Ploča je zatim ostavljana 45 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je rastvor fibronektina uklanjan iz bunarića, a ploča ostavljana da se bunarići osuše 45 min na sobnoj temperaturi. Bunarići su potom ispirani sa 1 mL PBS-a po bunariću, i ploča je ostavljana do upotrebe. Na dan eksperimenta, bunarići ploče su blokirani sa 1 mL 1% rastvora BSA u PBS-u po bunariću. Blokiranje je trajalo najmanje 1 h na sobnoj temperaturi, nakon čega je rastvor BSA uklanjan, a bunarići ispirani sa po 1 mL PBS-a. Ovako pripremljena ploča je korišćena u eksperimentu.

U cilju utvrđivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e na adheziju ćelija za fibronektin, za svaki tretman i kontrolu zasejavano je po 800 000 ćelija u 2 mL kompletnog medijuma po jednom bunariću ploče sa šest bunarića. Nakon 24 h, medijum iz bunarića je pažljivo uklanjan, nakon čega je dodavano po 2,5 mL kompletnog medijuma sa razblaženim radnim rastvorima PFOS-a, odnosno PFOA-e i kontrole (DMSO). Ploča je potom ostavljana u inkubator na 37 °C. Po isteku 48 h, medijum je pažljivo uklanjan, ćelije su ispirane sa 3 mL PBS-a po bunariću, a zatim je dodavano 0,5 mL tripsina po bunariću kako bi se ćelije odlepile. Ploča je ostavljana u inkubator na 4 min. Nakon inkubacije, dodavano je 1,5 mL kompletnog medijuma po bunariću da bi se inhibirao tripsin koji je razgradio proteine ECM-a, sadržaj je dobro izmešan provlačenjem kroz pipetu 10 puta i prenošen u konične tubice zapremine 15 mL. Ćelijska suspenzija je centrifugirana 5 min na 400 ×g, na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja, supernatant je pažljivo uklanjan, a ćelije su ispirane sa po 3 mL PBS-a i ponovo centrifugirane pri istim uslovima, kako bi se uklonili ostaci seruma. Supernatant je pažljivo uklanjan, a talog ćelija je resuspendovan u 1 mL pufera za adheziju (0,5% BSA, 1 mM $CaCl_2$, 1 m $MgCl_2$, 0,2 mM $MnCl_2$ u DMEM-u bez seruma, pH 7,4). Ćelije su nakon toga brojane, a zatim je po 420 000 ćelija prebacivano u novi set tubica od 1,5 mL (ukupno osam tubica, za svaki tretman i kontrolu po dve). U suspenziju ćelija je potom dodavan pufer za adheziju do konačne zapremine od 1,2 mL. Po 1 mL suspenzije ćelija u puferu za adheziju je zasejavano u ploču sa dvanaest bunarića (400 000 ćelija po bunariću; za svaki tretman i kontrolu po dva bunarića, ukupno osam) koja je prethodno obložena fibronektinom i blokirana 1% rastvorom BSA u PBS-u po gore opisanom protokolu. Ploča je potom inkubirana 30 min na 37 °C. Ćelije su nakon inkubacije pažljivo ispirane tri puta sa 1 mL DMEM-a po bunariću, kako bi se uklonile nevezane ćelije, nakon

čega je u svaki bunarić dodavano po 1 mL kompletnog medijuma. Ćelije su zatim fotografisane pod invertnim svetlosnim mikroskopom. Kvantifikacija dobijenih rezultata izvršena je pomoću testa sa bojom SRB (opisano u poglavlju 4.9), a dobijeni rezultati vezivanja ćelija za ECM izraženi su kao procenat EA.hy926 ćelija koje su se vezale za fibronektin u odnosu na kontrolu, čija je vrednost predstavljena kao 100%.

4.9. Određivanje broja EA.hy926 ćelija testom sa bojom sulforodamin B

Metoda određivanja broja ćelija pomoću boje SRB predstavlja jednostavnu i pouzdanu kolorimetrijsku tehniku za procenu ukupnog proteinskog sadržaja adherentnih ćelija, što indirektno odražava njihov broj. Naime, prisustvo većeg broja živih ćelija dovodi do usvajanja veće količine boje, što se može izmeriti spektrofotometrijski. SRB je anjonska azoboja koja se pri niskom pH nepovratno vezuje za osnovne amino grupe ćelijskih proteina. Na početku, ćelije se fiksiraju pomoću TCA, zatim boje, a višak boje se uklanja ispiranjem sa kiselim rastvorom. Boja koju su usvojile ćelije se potom rastvara u baznom rastvoru, a apsorbanca se meri spektrofotometrijski. Ova metoda je visoko osetljiva, pogodna za testiranje velikog broja uzoraka i često se koristi za ispitivanje proliferacije, citotoksičnosti i efekata lekova u ćelijskim kulturama, ali i u druge svrhe.

Test sa bojom SRB je korišćen za određivanje broja ćelija koje su se vezale za fibronektin (opisano u poglavlju 4.8), kao i za normalizaciju rezultata merenja nivoa ROS-a (opisano u poglavlju 4.15) i NO-a (opisano u poglavlju 4.16) nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e. Ćelije su prvo fiksirane tokom 1 h na 4 °C korišćenjem TCA (50% w/v pripremana u hladnoj dH_2O). Kiselina je dodavana na postojeći medijum u količini 1/4 početne zapremine medijuma (250 µL na 1 mL za ploču sa dvanaest bunarića ili 25 µL na 100 µL za ploču sa 96 bunarića). Nakon fiksiranja ćelija za dno bunarića, sadržaj iz bunarića je uklanjan, a fiksirane ćelije su ispirane pet puta sa po 1 mL ili 100 µL dH_2O po bunariću. Nakon poslednjeg ispiranja, u svaki bunarić je dodavano po 0,5 mL ili 50 µL 0,4% rastvora boje SRB razblažene u 1% rastvoru sirćetne kiseline. Ploča je zatim inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi, kako bi se boja vezala za aminokiselinske ostatke proteina u ćelijama. Nakon završene inkubacije, obojene ćelije su ispirane pet puta sa 1 mL ili 100 µL 1% rastvora sirćetne kiseline po bunariću, kako bi se uklonio višak nevezane boje. Isprana ploča je sušena na vazduhu, a potom je u bunariće dodavan pufer (10 mM Tris baza, pH 10,5) u zapremini identičnoj

početnoj zapremini medijuma (1 mL ili 100 μL), kako bi se rastvorila boja vezana u ćelijama. Ploča je inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi, a zatim je iz ploče sa dvanaest bunarića sadržaj prebacivan u ploču sa 96 bunarića (100 μL po bunariću, četiri ponavljanja za svaku tretiranu grupu i kontrolu), dok je ploča od 96 bunarića direktno korišćena za merenje apsorbance. Apsorbance su očitavane na spektrofotometru Thermo Labsystems Multiscan EX na talasnoj dužini λ_1=492 nm i referentnoj talasnoj dužini λ_2=690 nm. Konačna vrednost signala je izračunata kao razlika prve i druge apsorbance ($A = A_{492\ nm} - A_{690\ nm}$).

4.10. Određivanje angiogeneze EA.hy926 ćelija

Angiogeneza se u uslovima *in vitro* često ispituje testom formiranja endotelnih tubula u trodimenzionalnom gelastom matriksu koji simulira rekonstituisanu bazalnu membranu (Arnaoutova i Kleinman, 2010). U ovom testu koristi se matriks bez egzogenih faktora rasta, što omogućava praćenje sposobnosti endotelnih ćelija da iniciraju i održe proces organizacije u kapilarne strukture samostalno ili pod uticajem različitih supstanci. Kvantifikacija obično obuhvata merenje ukupne dužine tubula, broja čvorova i segmenata, površine pokrivenog područja i drugih parametara, čime se dobija objektivan pokazatelj angiogenog potencijala ispitivanih supstanci.

U cilju utvrđivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e na angiogenezu u uslovima *in vitro*, za svaki tretman i kontrolu zasejavano je 600 000 ćelija u 2 mL kompletnog medijuma po jednom bunariću ploče sa šest bunarića. Nakon 24 h, medijum iz bunarića je pažljivo uklanjan, nakon čega je dodavano po 2,5 mL kompletnog medijuma sa razblaženim radnim rastvorima PFOS-a, odnosno PFOA-e i kontrole (DMSO). Ploča je potom ostavljana u inkubator na 37 °C. Po isteku 48 h, neposredno pre izvođenja eksperimenta, na ledu je odmrzavan jedan alikvot Cultrex™ matriksa. Cultrex™, koji predstavlja rekonstituisanu bazalnu membranu bogatu proteinima poput laminina, kolagena IV i entaktina, pokazuje izrazitu temperaturnu osetljivost. U čvrstom je stanju kada je zamrznut na –80 °C, dok na temperaturi od 0–4 °C ostaje u tečnom stanju, što omogućava lako pipetiranje, mešanje sa ćelijama ili nanošenje na površinu ploča za ćelijsku kulturu. Međutim, pri sobnoj temperaturi (oko 20–25 °C) i naročito na 37 °C, Cultrex™ brzo polimerizuje i prelazi u gelasto trodimenzionalno stanje koje oponaša uslove *in vivo*. Zbog toga je ključno da se sve manipulacije obavljaju na ledu i sa prethodno rashlađenim pipetama, nastavcima i pločama,

kako bi se sprečila prerana gelacija i obezbedila ravnomerna primena. U osam bunarića na ledu ohlađene ploče sa 96 bunarića dodavano je po 50 µL tečnog Cultrex™ matriksa, a u okolne bunariće je dodavano po 200 µL hladnog PBS-a. Ploča je ostavljana u inkubator na 37 °C, najmanje 45 min, kako bi Cultrex™ prešao u stanje gela. Za to vreme, pripremane su ćelije sa tretmanima. Medijum je pažljivo uklanjan iz bunarića ploče u kojoj su gajene ćelije, ćelije su zatim ispirane sa 3 mL PBS-a po bunariću, a zatim je dodavano 0,5 mL tripsina po bunariću kako bi se ćelije odlepile. Ploča je ostavljana u inkubator na 4 min. Nakon inkubacije, dodavano je 1,5 mL kompletnog medijuma po bunariću da bi se inhibirao tripsin koji je razgradio proteine ECM-a, sadržaj je dobro izmešan provlačenjem kroz pipetu 10 puta, a zatim prenet u konične tubice zapremine 15 mL. Ćelijska suspenzija je centrifugirana 5 min na 400 ×g, na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja, supernatant je pažljivo uklanjan, a ćelije su ispirane sa po 3 mL PBS-a i ponovo centrifugirane pri istim uslovima, kako bi se uklonili ostaci seruma. Supernatant je pažljivo uklanjan, a talog ćelija je resuspendovan u 1 mL medijuma bez seruma. Ćelije su nakon toga brojane, a zatim je po 150 000 ćelija u 0,5 mL medijuma bez seruma prebacivano u novi set tubica od 1,5 mL. U suspenziju ćelija je potom dodavano po 0,5 mL odgovarajućih tretmana pripremljenih u medijumu bez seruma (razblaženje 1000 puta), tako da je finalno razblaženje iznosilo 2000 puta. Suspenzija ćelija sa odgovarajućim tretmanima je homogenizovana provlačenjem kroz nastavak pipete od 200 µL 20 puta, a zatim je po 100 µL ovako pripremljene suspenzije dodavano u bunariće ploče sa 96 bunarića u kojima se nalazilo 50 µL Cultrex™ gela. Na ovaj način je u svakom bunariću ploče zasejavano po 15 000 ćelija. Ploča sa ćelijama je ostavljana u inkubator na 37 °C. Nakon 8 h, ćelije su posmatrane pod invertnim svetlosnim mikroskopom sa faznim kontrastom i fotografisane (tri fotografije po bunariću). Morfometrijska analiza je sprovedena korišćenjem alata Angiogenesis Analyzer u sklopu programa NIH Image J (Carpentier i sar., 2020). Ovaj alat daje podatke o dvadeset parametara angiogeneze za svaku analiziranu fotografiju, dok je za statističku obradu izdvajano šest najrelevantnijih: ukupna dužina tubula, broj čvorova, broj ukrštanja, broj segmenata, ukupna dužina segmenata i ukupna dužina račvanja. Rezultati su zatim izraženi kao procenat angiogeneze u uslovima *in vitro* u odnosu na kontrolu, čija je vrednost predstavljena kao 100%.

4.11. Ispitivanje vezivanja monocita za monosloj EA.hy926 ćelija

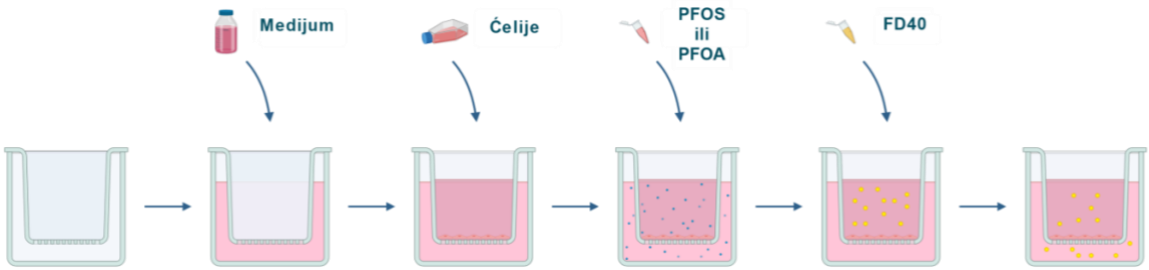
Vezivanje U937 ćelija za EA.hy926 ćelije je eksperiment kojim se u uslovima *in vitro* ispituje interakcija između monocita i endotelnih ćelija, simulirajući pri tom uslove *in vivo*, u krvnim sudovima. Test se zasniva na detekciji fluorescentnog signala poreklom od U937 monocita obeleženih fluorescentnom bojom kalcein AM nakon vezivanja za monosloj EA.hy926 ćelija. Merenjem fluorescencije, odnosno određivanjem broja vezanih monocita, mogu se detektovati promene u hemoatrakciji monocita od strane EA.hy926 ćelija. Ove promene se posredno mogu dovesti u vezu sa aktivacijom endotelnih ćelija, čime se dobijaju informacije o uticaju PFOS-a i PFOA-e na inflamacijski odgovor endotela.

U cilju utvrđivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e na vezivanje monocita za monosloj endotelnih ćelija, za svaki tretman i kontrolu zasejavano je 500 000 ćelija u 2 mL kompletnog medijuma po jednoj Petri posudi prečnika 35 mm (u daljem tekstu: 35 mm posude), po dve 35 mm posude za svaku eksperimentalnu grupu. Nakon 24 h, medijum iz posuda je pažljivo uklanjan, nakon čega je dodavano po 3 mL kompletnog medijuma sa razblaženim radnim rastvorima PFOS-a, odnosno PFOA-e i kontrole (DMSO). Posude su potom ostavljane u inkubator na 37 °C. Po isteku 48 h, neposredno pre izvođenja eksperimenta, U937 ćelije su obeležavane fluorescentnom bojom kalcein AM. Približno 20 miliona ćelija je inkubirano u rastvoru boje kalcein AM tokom 30 min na 37 °C. Da bi se dobila finalna koncentracija boje od 1 µg/mL, potrebno je razblažiti 20 µL boje kalcein AM koncentracije 1 mg/mL u 2 mL medijuma RPMI-1640 bez seruma za 20 miliona ćelija. Nakon inkubacije, fluorescentno obeležene U937 ćelije su centrifugirane 6 min na 300 ×g, supernatant je pažljivo uklanjan, a fluorescentno obeležene ćelije su ispirane dva puta sa po 5 mL PBS-a, kako bi se uklonio ostatak boje koja nije vezana za ćelije. Nakon poslednjeg ispiranja i centrifugiranja, talog ćelija je resuspendovan u medijumu RPMI-1640 sa 10% FBS-a. EA.hy926 ćelije u 35 mm posudama su ispirane dva puta sa po 2 mL DMEM-a po posudi, nakon čega je 1 mL suspenzije U937 ćelija obeleženih bojom kalcein AM dodavan preko EA.hy926 ćelija (2 miliona obeleženih U937 ćelija po jednoj 35 mm posudi). Posude su inkubirane u mraku 1 h na 37 °C. Nakon završene inkubacije, ćelije u posudama su ispirane dva puta sa po 2 mL HBSS-a kako bi se uklonile nevezane fluorescentno obeležene U937 ćelije. Nakon poslednjeg ispiranja, dodavano je 1 mL HBSS-a po posudi, a potom su fluorescentno obeležene U937 ćelije vezane za monosloj EA.hy926 ćelija fotografisane na fluorescentnom mikroskopu Zeiss Axio Imager.A2 uz odgovarajuće postavke (filter FITC, ekspozicija 250

ms, gain factor 1, objektiv 10x, format slika JPEG). Kvantifikacija rezultata je urađena korišćenjem softvera NIH Image J (https://imagej.nih.gov/), analizom 10–15 nasumično uzetih fotografija sa fluorescentnog mikroskopa. Na fotografijama su ručno brojane U937 ćelije, označene fluorescentnom bojom kalcein AM, koje su se vezale za monosloj EA.hy926 ćelija. Za svaki tretman i kontrolu izračunata je srednja vrednost broja vezanih U937 ćelija. Dobijeni rezultati su izraženi kao procenat vezanih U937 ćelija u odnosu na kontrolu, čija je vrednost predstavljena kao 100%.

4.12. Ispitivanje propustljivosti monosloja EA.hy926 ćelija u Transwell® sistemu

U cilju ispitivanja uticaja PFOS-a i PFOA-e na integritet i propustljivost monosloja EA.hy926 ćelija korišćen je Transwell® sistem sa polikarbonatnom membranom, prečnika pora 0,4 µm. Metoda se zasniva na ispitivanju prolaska fluorescentnog molekula FITC-dekstrana visoke molekulske mase (FD40; Mw 40 kDa) kroz međućelijski prostor monosloja endotelnih ćelija i kroz mikroporoznu polikarbonatnu membranu iz gornjeg odeljka u donji odeljak Transwell® sistema (slika 4.9). Merenjem intenziteta fluorescencije u donjem odeljku moguće je detektovati uticaj tretmana na integritet endotelne barijere u uslovima *in vitro*.



Slika 4.9. Šematski prikaz postavke eksperimenta u cilju ispitivanja propustljivosti monosloja endotelnih ćelija u Transwell® sistemu nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e. Slika je kreirana u programu BioRender (https://www.biorender.com).

U cilju utvrđivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e na integritet i propustljivost monosloja endotelnih ćelija, EA.hy926 ćelije su sađene na površinu mikroporozne polikarbonatne membrane gornjeg odeljka Transwell® sistema (prečnik pora 0,4 µm, prečnik inserta 6,5

mm), i to tako što je za svaki tretman i kontrolu zasejavano 100 000 ćelija u 0,6 mL kompletnog medijuma po bunariću, po dva bunarića za svaku eksperimentalnu grupu. Pre početka rada, površina mikroporozne polikarbonatne membrane obložena je slojem fibronektina, na taj način što je 200 µL 5% fibronektina u DMEM-u dodavano po bunariću, a ploča je zatim inkubirana 45 min na sobnoj temperaturi. Potom je fibronektin uklanjan sa površine gornjeg odeljka Transwell® sistema, nakon čega su ćelije posađene na ovako pripremljenu mikroporoznu polikarbonatnu membranu. U donje odeljke je dodavano po 0,6 mL kompletnog medijuma. Nakon tri dana u kulturi, kompletni medijum je zamenjivan u oba odeljka (0,6 mL po odeljku), a ćelije su gajene još dva dana na 37 °C. Nakon što je uspostavljen kontinuirani monosloj endotelnih ćelija, koji predstavlja gustu selektivno propustljivu barijeru u Transwell® ploči, medijum iz gornjih i donjih odeljaka je pažljivo uklanjan, nakon čega je dodavano po 0,6 mL kompletnog medijuma sa razblaženim radnim rastvorima PFOS-a, odnosno PFOA-e i kontrole (DMSO) u oba odeljka Transwell® ploče. Ploča je potom ostavljana u inkubator na 37 °C. Po isteku 48 h, medijum sa tretmanima je pažljivo uklanjan, nakon čega su gornji i donji odeljci Transwell® ploče ispirani dva puta sa po 0,5 mL HBSS-a. Nakon poslednjeg ispiranja, u donje odeljke je dodavano po 0,5 mL HBSS-a, dok je u gornje odeljke dodavano po 0,3 mL HBSS-a, a nakon toga još po 0,1 mL rastvora FD40 u HBSS-u koncentracije 4 mg/mL, čime je postignuta konačna koncentracija FD40 u HBSS-u od 1 mg/mL (razblaženje 4 puta). Transwell® ploča je vraćana u inkubator na 37 °C, a zatim je nakon 15, 30, 60 i 120 min po 100 µL HBSS-a sa FD40 iz donjih odeljaka prebacivano u bunariće crne ploče sa 96 bunarića, nakon čega je meren intenzitet fluorescencije. Nakon svakog uzimanja uzorka iz donjeg odeljka Transwell® ploče dodavano je po 100 µL čistog rastvora HBSS-a nazad u donji odeljak kako bi se očuvala ukupna zapremina. Fluorescencija je merena na fluorimetru Thermo Labsystems Fluoroskan Ascent sa prethodno podešenim talasnim dužinama: $\lambda ex = 485$ nm i $\lambda em = 538$ nm. Intenzitet fluorescentnog signala meren je za sve četiri vremenske tačke, a dobijene vrednosti su iskorišćene za izračunavanje prosečne promene propustljivosti konfluentnog monosloja EA.hy926 ćelija tokom vremena (5 min interval). Rezultati su zatim izraženi kao procenat propustljivosti u odnosu na kontrolu, čija je vrednost predstavljena kao 100%. Nakon završenog poslednjeg merenja fluorescentnog signala, ćelije na polikarbonatnoj membrani su ispirane dva puta sa po 0,5 mL hladnog PBS-a u gornjem i donjem odeljku, zatim lizirane puferom za liziranje RIPA (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0,5% natrijum-deoksiholat, 0,1% SDS, pH 7,4) na 4 °C tokom 40 min, a potom je koncentracija proteina u lizatima određena prema protokolu koji je opisan u poglavlju 4.13.

4.13. Određivanje koncentracije proteina u EA.hy926 ćelijama metodom Pierce™ BCA

Koncentracija proteina u uzorcima određivana je kolorimetrijskom metodom korišćenjem komercijalnog kompleta Pierce™ BCA (bicinhoninska kiselina) Protein Assay Kit, u skladu sa uputstvima proizvođača. Metoda se zasniva na činjenici da u baznom rastvoru proteini redukuju bakarne jone ($Cu^{2+} \rightarrow Cu^{1+}$), a formirani Cu^{1+} zatim reaguje sa reagensom BCA, pri čemu nastaje kompleks intenzivno ljubičaste boje. Jačina razvijene boje proporcionalna je koncentraciji proteina i meri se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 540 nm. Metoda je visoko osetljiva (detekcija već od ~0,5 μg proteina/mL uzorka), relativno otporna na brojne surfaktante i kompatibilna sa većinom pufera.

U ploču sa 96 bunarića je u duplikatima pipetirano po 10 μL standardnih rastvora proteina (raspona koncentracija 25–2000 μg/mL) i uzoraka koji su mešani sa puferom za liziranje RIPA u odnosu 1:1 (5 μL uzoraka i 5 μL pufera za liziranje RIPA), čime je postignuto dvostruko razblaženje uzoraka. Potom je u sve bunariće dodavano po 200 μL reagensa BCA koji je dobijen mešanjem reagenasa A i B u odnosu 50:1. Ploča je zatim inkubirana 30 min na 37 °C, nakon čega su apsorbance merene na spektrofotometru Thermo Labsystems Multiscan EX (talasna dužina: λ = 540 nm). Na osnovu izmerenih vrednosti apsorbance, parametara standardne krive i faktora razblaženja uzoraka izračunata je koncentracija proteina u svakom uzorku, izražena u mg/mL.

4.14. Određivanje ekspresije i fosforilacije proteina u EA.hy926 ćelijama metodom Western blot

Western blot je široko korišćena metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje nivoa ekspresije i fosforilacije proteina u biološkim uzorcima. Tehnika se zasniva na odvajanju proteinskih komponenti elektroforezom u gelu prema njihovoj molekulskoj masi, nakon čega se proteini prenose na odgovarajuću membranu. Membrana se zatim inkubira sa specifičnim primarnim antitelima usmerenim na ciljane proteine ili njihove fosforilisane forme, a potom sa sekundarnim antitelima konjugovanim sa enzimom ili fluorescentnim markerom za detekciju. Signal se vizualizuje odgovarajućim sistemima, poput hemiluminescencije ili fluorescentnog skeniranja, pri čemu intenzitet signala proporcionalno odražava količinu proteina. Korišćenjem fosfo-specifičnih antitela, Western blot omogućava

ne samo merenje ukupnog proteina, već i procenu njegovog aktivacionog statusa kroz fosforilaciju.

4.14.1. Priprema uzoraka za elektroforezu

U cilju utvrđivanja uticaja izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e u trajanju od 48 h na ekspresiju okludina, ZO-1 i eNOS-a, ćelije u gornjem odeljku Transwell® sistema su nakon završenog merenja propustljivosti monosloja EA.hy926 ćelija (opisano u poglavlju 4.12) ispirane dva puta sa po 0,5 mL hladnog PBS-a u gornjem i donjem odeljku. Potom je u svaki gornji odeljak Transwell® ploče dodavano po 150 µL pufera za liziranje koji se sastojao od pufera RIPA i komercijalnog koktela inhibitora proteaza. Ćelije su lizirane 40 min na 4 °C, uz povremeno prelivanje pufera za liziranje preko površine polikarbonatne membrane. Ćelijski lizat je sakupljan u na ledu ohlađene tubice zapremine 1,5 mL i centrifugiran 10 min na 14 000 ×g, 4 °C. Po isteku centrifugiranja, supernatant je pažljivo prebacivan u nove tubice od 1,5 mL koje su sve vreme držane na ledu.

U cilju utvrđivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e na fosforilaciju (aktivaciju) eNOS-a, za svaki tretman i kontrolu zasejavano je po 600 000 ćelija u 0,8 mL kompletnog medijuma po jednom bunariću ploče sa dvanaest bunarića. Nakon 24 h, medijum iz bunarića je pažljivo uklanjan, nakon čega su ćelije ispirane dva puta sa 3 mL PBS-a po bunariću, kako bi se uklonili tragovi seruma iz kompletnog medijuma. Zatim je dodavano 0,6 mL medijuma bez seruma po bunariću u cilju „izgladnjivanja" ćelija (engl. *starvation*). Ploča je potom ostavljana u inkubator na 37 °C. Posle 24 h, na već postojećih 0,6 mL medijuma bez seruma u bunariću dodavano je 0,6 mL medijuma bez seruma sa razblaženim radnim rastvorima PFOS-a, odnosno PFOA-e i kontrole (DMSO), tako da je finalno razblaženje bilo 2000 puta. Ćelije su izlagane 15, 30 i 60 min. Po isteku odgovarajućeg vremena izlaganja, medijum sa tretmanima je uklanjan, a ćelije su ispirane dva puta sa 0,5 mL hladnog PBS-a po bunariću. Nakon poslednjeg ispiranja, u svaki bunarić je dodavano po 100 µL pufera za liziranje RIPA koji je sadržao inhibitore proteaza, kao i inhibitore fosfataza (1 mM natrijum-fluorid i 1 mM natrijum-ortovanadat), nakon čega su ćelije lizirane 40 min na 4 °C. Ćelijski lizati su sakupljani u na ledu ohlađene tubice zapremine 1,5 mL i centrifugirani 10 min na 14 000 ×g, 4 °C. Po isteku centrifugiranja, supernatant je pažljivo prebacivan u nove tubice od 1,5 mL koje su sve vreme držane na ledu.

Koncentracija proteina u svim uzorcima je određivana pomoću kompleta za određivanje proteina Pierce™ BCA Protein Assay Kit, prema protokolu opisanom u poglavlju 4.13. Uzorci za elektroforezu su pripremani mešanjem 5× koncentrovanog pufera sa redukujućim agensima (engl. *reducing sample buffer*, RSB) i uzorcima u odnosu 1:4, što je dalo sledeće finalne koncentracije u svakom uzorku: 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% glicerol, 5% β-merkaptoetanol, 0,1 M ditiotreitol i 0,01% bromofenol-plavo. Nakon pripreme, uzorci su inkubirani 5 min na 96 °C, a potom su ili neposredno korišćeni ili čuvani na –20 °C do upotrebe.

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

U cilju detekcije i kvantifikacije proteina pravljeni su gelovi koji su imali deo za koncentrovanje uzoraka (3% gel: 4,575 mL H_2O, 1,875 mL 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 75 µL 10% rastvora SDS-a, 0,9975 mL 30% rastvora akrilamida/bis-akrilamida, 37,5 µL 10% rastvora amonijum-persulfata, 7,5 µL TEMED-a) i deo za razdvajanje uzoraka (10% gel: 4,015 mL H_2O, 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 100 µL 10% rastvora SDS-a, 3,335 mL 30% rastvora akrilamida/bis-akrilamida, 50 µL 10% rastvora amonijum-persulfata, 5 µL TEMED-a; 7,5% gel: 4,85 mL H_2O, 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 100 µL 10% rastvora SDS-a, 2,5 mL 30% rastvora akrilamida/bis-akrilamida, 50 µL 10% rastvora amonijum-persulfata, 5 µL TEMED-a). Za detekciju i kvantifikaciju ZO-1 korišćen je 7,5% gel, dok su za detekciju okludina, eNOS-a i fosfo-eNOS-a pravljeni 10% gelovi.

Jednake količine uzoraka (10–15 µg proteina) su nalivane u bunariće poliakrilamidnog gela sa SDS-om, dok je proteinski marker nalivan u zasebni bunarić. U slobodne bunariće (bez uzoraka ili proteinskog markera) nalivan je RSB. Elektroforeza je sprovođena u Mini–PROTEAN™ Tetra Cell sistemu (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, SAD) tako što su proteini prvih nekoliko minuta pokretani konstantnim naponom od 120 V dok ne uđu u gel za razdvajanje, a zatim je napon povećan na 200 V do završetka razdvajanja. Transfer proteina na PVDF membranu (veličina pora 0,2 µm; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, SAD) izvršen je pri 100 V tokom 120–140 min. Membrane su potom blokirane 2 h na sobnoj temperaturi u TBS/Tween-u (10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,4 sa 0,1% Tween-20) sa 5% BSA (za analizu fosforilacije) ili 5% nemasnog mleka u prahu (za analizu ukupnog proteina). Zatim su membrane preko noći inkubirane na 4 °C u rastvorima primarnih antitela koja su pravljena u TBS/Tween-u sa 5% BSA: fosfo-eNOS

(1:1000), eNOS (1:1000), ZO-1 (1:1000) i okludin (1:500). Sledećeg dana su membrane ispirane puferom TBS/Tween (pet puta po 5 min) i inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelom konjugovanim sa HRP-om (1:3000) u TBS/Tween-u sa 5% BSA. Nakon toga su membrane tri puta ispirane naizmenično puferom NTBS (TBS sa 1% NP-40) i TBS po 5 min svaki, a zatim je hemiluminescentni signal razvijan pomoću reagensa SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate i detektovan na myECL Digital Imaging System (Thermo Scientific). Kvantifikacija je obavljena u programu NIH Image J.

Za uklanjanje vezanih antitela (tzv. stripovanje; engl. *membrane stripping*), membrane su inkubirane 30 min na 56 °C u puferu za stripovanje (65 mM Tris-HCl, pH 6,7, 20% SDS-a, 0,7% β-merkaptoetanola), potom ispirane puferom NTBS (pet puta po 5 min) i jednom 5 min puferom TBS uz intenzivno mešanje. Nakon stripovanja, membrane su ponovo blokirane i inkubirane sa primarnim antitelima za endogene kontrolne proteine (GAPDH, 1:5000 ili vinkulin, 1:3000) ili nefosforilisane forme prethodno analiziranih proteina (eNOS, 1:1000), a detekcija i kvantifikacija su ponovljeni kao što je prethodno opisano.

4.15. Određivanje nivoa reaktivnih vrsta kiseonika u EA.hy926 ćelijama pomoću reagensa H_2DCFDA

Određivanje nivoa ROS-a u ćelijama pomoću reagensa H_2DCFDA predstavlja široko korišćenu metodu za procenu oksidativnog stresa u uslovima *in vitro*. H_2DCFDA je nefluorescentni molekul koji slobodno ulazi u ćelije gde pod delovanjem esteraza gubi acetatne grupe, formirajući pri tome 2′,7′-dihlorodihidrofluorescein (H_2DCF), koji ostaje zarobljen unutar ćelija. U prisustvu ROS-a, posebno vodonik-peroksida i peroksidnih radikala, H_2DCF se oksiduje u visoko fluorescentni molekul 2′,7′-dihlorofluorescein (DCF). Intenzitet fluorescencije poreklom od DCF-a direktno je proporcionalan količini intracelularno generisanih ROS-ova, što omogućava kvantitativnu analizu oksidativnog statusa ćelija pod različitim uslovima ili tretmanima.

U cilju utvrđivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e na stvaranje ROS-a, za svaki tretman i kontrolu zasejavano je po 25 000 ćelija u 200 µL kompletnog medijuma u dvanaest bunarića ploče sa 96 bunarića – četiri bunarića su korišćena za slepu probu (bez H_2DCFDA), osam za

dodavanje rastvora H_2DCFDA. Nakon 24 h, medijum je pažljivo uklanjan multikanalnom pipetom, a u bunariće je dodavano po 200 µL razblaženih radnih rastvora PFOS-a, odnosno PFOA-e i kontrole (DMSO) u kompletnom medijumu. Ploča je potom ostavljana u inkubator na 37 °C. Po isteku 48 h, medijum sa tretmanima je pažljivo uklanjan multikanalnom pipetom, nakon čega su ćelije u bunarićima ispirane dva puta sa 200 µL HBSS-a po bunariću. Ploča je kratko vraćana u inkubator, na 10 min, a za to vreme je pripreman rastvor 50 µM H_2DCFDA u HBSS-u. U bunariće za slepu probu je dodavano po 100 µL HBSS-a, dok je u ostale bunariće dodavano po 100 µL rastvora H_2DCFDA. Ploča je zatim zaštićena od svetlosti i inkubirana 45 min na 37 °C. Po isteku inkubacije, ćelije su ispirane dva puta sa 100 µL PBS-a po bunariću, nakon čega je dodavano 100 µL 10 mM HEPES-a (pH 7,4) po bunariću. Fluorescentni signal je meren na fluorimetru Thermo Labsystems Fluoroskan Ascent sa prethodno podešenim talasnim dužinama: λex=485 nm i λem=538 nm. Kvantifikacija dobijenih rezultata izvršena je tako što je signal poreklom od ćelija koje nisu tretirane H_2DCFDA (slepa proba) najpre oduziman od vrednosti merenja u svim bunarićima sa H_2DCFDA, nakon čega su vrednosti normalizovane na broj ćelija prisutnih u svakom bunariću određen pomoću testa sa bojom SRB prema protokolu opisanom u poglavlju 4.9. Rezultati su zatim izraženi kao procenat nivoa ROS-a u odnosu na kontrolu, čija je vrednost predstavljena kao 100%.

4.16. Određivanje nivoa azot-monoksida u EA.hy926 ćelijama pomoću reagensa DAF-FM DA

Određivanje NO-a u ćelijama pomoću reagensa DAF-FM DA predstavlja osetljivu i specifičnu metodu za detekciju intracelularnog NO-a u realnom vremenu. DAF-FM DA je nefluorescentni molekul koji slobodno ulazi u ćelije gde podleže deacetilaciji pod delovanjem intracelularnih esteraza, čime nastaje DAF-FM, oblik koji ostaje unutar ćelije. U prisustvu NO, DAF-FM reaguje sa nitrozijum-jonom (NO^+), stvarajući fluorescentni proizvod čiji se intenzitet meri fluorometrijski. Metoda je pogodna za kvantifikaciju bazalne i stimulisane sinteze NO-a, naročito u endotelnim i imunskim ćelijama, a koristi se u istraživanjima inflamacije, vaskularne funkcije i oksidativnog stresa.

U cilju utvrđivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e na stvaranje NO-a, za svaki tretman i kontrolu zasejavano je po 15 000 ćelija u 200 µL kompletnog medijuma u šest bunarića ploče

sa 96 bunarića (za određivanje nivoa NO-a pomoću fluorimetra). Pored toga, u šest bunarića bez ćelija dodavano je po 200 µL kompletnog medijuma (slepa proba), dok je šest bunarića sa zasejanim ćelijama ostavljeno za pozitivnu kontrolu – DPTA NONOat, poznati donor NO-a koji spontano disosuje u reakciji prvog reda zavisnoj od pH vrednosti, sa poluvremenom raspada od 3 h na 37 °C pri pH 7,4. Nakon 24 h, medijum je pažljivo uklanjan multikanalnom pipetom, a u bunariće je dodavano po 200 µL razblaženih radnih rastvora PFOS-a, odnosno PFOA-e i kontrole (DMSO) u kompletnom medijumu. U bunariće ostavljene za pozitivnu kontrolu dodavano je po 200 µL kompletnog medijuma bez tretmana. Ploča je potom ostavljana u inkubator na 37 °C. Po isteku 48 h, medijum sa tretmanima je pažljivo uklanjan multikanalnom pipetom, nakon čega su ćelije u bunarićima ispirane dva puta sa 200 µL HBSS-a po bunariću. Ploča je kratko vraćana u inkubator, na 10 min, a za to vreme je pripreman rastvor 2,5 µM DAF-FM DA u HBSS-u (4 µL 5 mM DAF-FM DA u 8 mL HBSS-a). Dodavano je po 100 µL 2,5 µM DAF-FM DA po bunariću. Ploča je zatim zaštićena od svetlosti i inkubirana ukupno 45 min na 37 °C. Nakon 15 min inkubacije, u šest bunarića ploče sa 96 bunarića koji su ostavljeni za pozitivnu kontrolu dodavano je po 2 µL 10 mM rastvora DPTA NONOata, čime je postignuta finalna koncentracija od 100 µM. Osnovni rastvor DPTA NONOata koncentracije 10 mM (5 mg DPTA NONOata u 2,616 mL NaOH) čuvan je na –80 °C do upotrebe. Po dodavanju DPTA NONOata, ploča je vraćana u inkubator na dodatnih 30 min. Po isteku inkubacije, ćelije u ploči su ispirane dva puta sa 200 µL PBS-a po bunariću, nakon čega je dodavano 100 µL PBS-a po bunariću. Fluorescentni signal je meren na fluorimetru Thermo Labsystems Fluoroskan Ascent sa prethodno podešenim talasnim dužinama: λex=485 nm i λem=538 nm. Kvantifikacija dobijenih rezultata izvršena je tako što je signal poreklom iz bunarića u kojima nisu bile zasejane ćelije (slepa proba) najpre oduziman od vrednosti merenja u svim bunarićima sa ćelijama, nakon čega su vrednosti normalizovane na broj ćelija u svakom bunariću određen pomoću testa sa bojom SRB prema protokolu opisanom u poglavlju 4.9. Rezultati su zatim izraženi kao procenat nivoa NO-a u odnosu na kontrolu, čija je vrednost predstavljena kao 100%.

U svrhu vizuelnog prikaza uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e na stvaranje NO-a, zasejavano je po 500 000 ćelija u 2 mL kompletnog medijuma, po jedna 35 mm posuda za svaki tretman, kontrolu i pozitivnu kontrolu (DPTA NONOat). Nakon 24 h, medijum je pažljivo uklanjan, a u posude je dodavano po 4 mL razblaženih radnih rastvora PFOS-a, odnosno PFOA-e i kontrole (DMSO) u kompletnom medijumu. U posudu ostavljenu za

pozitivnu kontrolu dodavano je 4 mL kompletnog medijuma bez tretmana, nakon čega su posude ostavljane u inkubator na 37 °C. Po isteku 48 h, medijum sa tretmanima je pažljivo uklanjan, nakon čega su ćelije ispirane dva puta sa po 3 mL HBSS-a po posudi. Posude su kratko vraćane u inkubator, na 10 min, a za to vreme je pripreman rastvor 2,5 μM DAF-FM DA u HBSS-u (9 μL 5 mM DAF-FM DA u 18 mL HBSS-a). Dodavano je 2 mL 2,5 μM DAF-FM DA po posudi, nakon čega su posude zaštićene od svetlosti i inkubirane ukupno 45 min na 37 °C. Nakon 15 min inkubacije, u posudu ostavljenu za pozitivnu kontrolu dodavano je po 40 μL 10 mM rastvora DPTA NONOata, čime je postignuta finalna koncentracija od 100 μM. Po dodavanju DPTA NONOata, posuda je vraćana u inkubator na dodatnih 30 min. Po isteku inkubacije, ćelije su ispirane dva puta sa 3 mL PBS-a po posudi, nakon čega je dodavano 1 mL PBS-a po posudi. Ćelije su fotografisane na fluorescentnom mikroskopu Zeiss Axio Imager.A2 uz odgovarajuće postavke (filter FITC, ekspozicija 250 ms, gain factor 1, objektiv 10x, format slika JPEG).

4.17. Relativna kvantifikacija ekspresije gena u EA.hy926 ćelijama metodom RT-qPCR

Relativna kvantifikacija ekspresije gena metodom RT-qPCR predstavlja preciznu i osetljivu tehniku za merenje promene nivoa transkripata ciljanih gena u različitim eksperimentalnim uslovima. Metoda se zasniva na reverznoj transkripciji informacione RNK (iRNK) u kDNK, koja se zatim amplifikuje u realnom vremenu i detektuje pomoću fluorescentnih proba ili interkališućih boja poput SYBR Green. Promene u ekspresiji gena kvantifikuju se u odnosu na referentne (engl. *housekeeping*) gene, koristeći metodu poređenja praga ciklusa (ΔΔCt). Ovaj pristup omogućava pouzdano poređenje ekspresije između tretiranih i kontrolnih uzoraka, te se široko koristi u istraživanjima genske regulacije, ćelijskog odgovora na lekove, toksikoloških studija i kliničkoj dijagnostici.

4.17.1. Priprema uzoraka i izolacija ukupne RNK

U cilju utvrđivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e na ekspresiju gena, za svaki tretman i kontrolu zasejavano je po 600 000 ćelija u 2 mL kompletnog medijuma po jednom bunariću ploče sa šest bunarića. Nakon 24 h, medijum je pažljivo uklanjan iz bunarića, nakon čega je dodavano po 3 mL kompletnog medijuma sa razblaženim radnim rastvorima PFOS-a,

odnosno PFOA-e i kontrole (DMSO). Ploča je vraćana u inkubator na 37 °C. Po isteku 48 h, medijum je pažljivo uklanjan, ćelije su ispirane sa 2 mL PBS-a po bunariću, a zatim je dodavano 0,5 mL reagensa TRIzol™ po bunariću. Ovaj reagens se koristi u cilju liziranja ćelija i svih ćelijskih komponenata, a pored toga održava i integritet RNK zahvaljujući inhibiciji ribonukleaza. Ploča je inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi, nakon čega su uzorci sakupljani u tubice od 1,5 mL bez RNaza, DNaza i pirogena, snažno promućkani na vortex mešalici i čuvani na –80 °C do izolacije ukupne RNK.

Na dan izolacije ukupne RNK, uzorci su inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je u svaku tubicu dodavano po 100 µL hloroforma. Sadržaj u tubicama je zatim intenzivno promešan, a potom su uzorci inkubirani 15 min na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije, uzorci su centrifugirani 15 min na 16000 ×g na 4 °C, nakon čega je gornja vodena faza u kojoj se nalazila RNK prebacivana u novi set tubica od 1,5 mL bez RNaza, DNaza i pirogena. U tubice je zatim dodavano po 250 µL izopropanola kako bi se RNK istaložila. Sadržaj u tubicama je ponovo intenzivno promešan, a potom su uzorci inkubirani 15 min na sobnoj temperaturi. Uzorci su zatim centrifugirani 10 min na 16000 ×g na 4 °C, nakon čega je supernatant uklanjan, a dobijeni talog RNK ispiran sa 1 mL 75% etanola po tubici i intenzivno promešan. Nakon ispiranja, uzorci su centrifugirani 5 min na 7500 ×g na 4 °C, nakon čega je supernatant uklanjan, a uzorci ostavljani da se osuše na vazduhu, na sobnoj temperaturi. Ukupna RNK je potom resuspendovana u 30 µL H_2O tretirane dietilpirokarbonatom (engl. *diethyl pyrocarbonate*, DEPC). Nakon inkubacije od 10 min, sadržaj u tubicama je blago izmešan pomoću vorteks mešalice.

Koncentracija ukupne RNK određivana je pomoću spektrofotometra BioSpec-Nano (Shimadzu Corporation, Kjoto, Japan). Analizom apsorbance pri λ=260 nm (A_{260}) izračunavana je koncentracija RNK (izražena u ng/µL), dok su odnosi A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} korišćeni za procenu čistoće u odnosu na proteine i organske kontaminante, redom. Dobijene vrednosti su ukazale da je čistoća RNK bila u optimalnom opsegu, sa navedenim odnosima između 1,7 i 2,0.

4.17.2. Reverzna transkripcija

S obzirom na to da RNK ne može služiti kao matrica u PCR reakciji, lanac kDNK je sintetisan reverznom transkripcijom iRNK, korišćenjem kompleta High Capacity cDNA Reverse Transcription, u skladu sa uputstvom proizvođača. Za svaku reakciju korišćeno je

2 μg RNK u ukupnoj zapremini reakcione smeše od 20 μL. Reakciona smeša je sadržala: 10 μL RNK (2 μg) rastvorene u H_2O tretiranoj DEPC-om, 2 μL 10× RT pufera, 0,8 μL 100 mM dNTP, 2 μL 10× RT nasumičnih početnica (engl. *random primers*), 1 μL reverzne transkriptaze (50 U/μL) i 4,2 μL H_2O tretirane DEPC-om. Reverzna transkripcija sprovedena je u uređaju Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) kroz tri temperaturna koraka: 10 min na 25 °C (aktivacija početnica), 120 min na 37 °C (sinteza kDNK), 5 s na 85 °C (inaktivacija enzima). Dobijena kDNK je čuvana na –20 °C do upotrebe.

4.17.3. Kvantitativna RT-PCR analiza

Prevedena kDNK korišćena je za određivanje relativne ekspresije odabranih gena primenom metode RT-qPCR uz korišćenje kompleta Power SYBR Green PCR Master Mix. Fluorescentna boja SYBR Green vezuje se za dvolančanu DNK, pri čemu intenzitet fluorescencije proporcionalno raste sa količinom amplifikovane DNK tokom PCR reakcije. Ukupna zapremina reakcione smeše iznosila je 12,5 μL i sadržala je: 2,5 μL razblažene kDNK (u H_2O tretiranoj DEPC-om), 0,65 μL specifičnih uzvodnih (engl. *forward*, F) i nizvodnih (engl. *reverse*, R) početnica (tabela 4.1), 3,8 μL H_2O tretirane DEPC-om i 5 μL kompleta Power SYBR Green PCR Master Mix. Pored reakcija za gene navedene u tabeli 4.1 koje su sadržale uzorke kDNK, postavljena je i kontrola bez matrice (engl. *non-template control*), u kojoj se umesto kDNK nalazila H_2O tretirana DEPC-om. Za normalizaciju ekspresije korišćen je tzv. *housekeeping* gen *GAPDH*, koji je služio kao endogena kontrola. Analiza je pokazala da kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e nije uticalo na relativnu ekspresiju *GAPDH*-a.

Svi uzorci su analizirani u duplikatu pod sledećim uslovima PCR reakcije: 2 min na 50 °C (aktivacija enzima), 10 min na 95 °C (inicijalna denaturacija), 40 ciklusa denaturacije (15 s na 95 °C) i vezivanja početnica sa elongacijom (1 min na 60 °C). Reakcije su izvođene na uređaju MasterCycler RealPlex (Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

Po završetku qPCR reakcija, generisani su podaci o amplifikaciji ciljnih gena u funkciji broja ciklusa. Analiza rezultata je sprovedena primenom metode ΔΔCt, prema Livak i Schmittgen (2001), koja omogućava normalizaciju ekspresije ciljnih gena u odnosu na endogenu kontrolu i referentni (kontrolni) uzorak.

Tabela 4.1. Sekvence parova početnica korišćenih u RT-qPCR analizi.

Gen	Identifikacioni broj	Sekvence parova početnica
ICAM1	NM_000201	F: 5′-ATGTGCAAGAAGATAGCCAACCA-3′ R: 5′-TGGCAGCGTAGGGTAAGGTTC-3′
VCAM1	NM_001078	F: 5′-GTTGAAGGATGCGGGAGTAT-3′ R: 5′-GGATGCAAAATAGAGCACGA-3′
SELE	NM_000450	F: 5′-CTGGCCTGCTACCTACCTGT-3′ R: 5′-AGCTACCAAGGGAATGTTGG-3′
NOS3	NM_000603	F: 5′-GACCCTCACCGCTACAACAT-3′ R: 5′-CTGGCCTTCTGCTCATTTTC-3′
KDR	NM_002253	F: 5′-GTGATCGGAAATGACACTGGAG-3′ R: 5′-CATGTTGGTCACTAACAGAAGCA-3′
CDH5	NM_001795	F: 5′-TCACCTGGTCGCCAATCC-3′ R: 5′-AGGCCACATCTTGGGTTCCT-3′
VEGFA	NM_001025366	F: 5′-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3′ R: 5′-CACACAGGATGGCTTGAAGA-3′
PECAM1	NM_000017.11	F: 5′-TGCAGTGGTTATCATCGGAGTG-3′ R: 5′-CGTTGTTGGAGTTCAGAAGTG-3′
GAPDH	NM_002046	F: 5′-CAAGGCTGTGGGCAAGGT-3′ R: 5′-GGAAGGCCATGCCAGTGA-3′

Izračunavanje relativne ekspresije sprovedeno je kroz sledeće korake:

1. ΔCt = Ct (ciljni gen) – Ct (*GAPDH*)
2. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (tretman) – ΔCt (kontrola)
3. Relativna ekspresija (R) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Nivo ekspresije za sve ispitivane gene prikazan je kao vrednost $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.18. Sekvenciranje iRNK u EA.hy926 ćelijama

Sekvenciranje iRNK, poznato kao RNA-Seq, predstavlja savremenu i visoko efikasnu metodu za globalnu analizu ekspresije gena. Ova tehnologija omogućava kvantifikaciju transkripata, identifikaciju alternativnih varijanti spajanja, detekciju novih transkripata i uvid u dinamiku transkriptoma u različitim fiziološkim i patološkim stanjima. Proces započinje izolacijom ukupne RNK iz uzorka, zatim njenom konverzijom u kDNK, fragmentacijom, dodavanjem adaptera i sekvenciranjem uz pomoć platformi visokog protoka. Dobijene sekvence se bioinformatički obrađuju kako bi se mapirale na referentni genom ili transkriptom i kvantifikovala ekspresija pojedinačnih gena. RNA-Seq je postala

ključna metoda u molekularnoj biologiji, posebno u oblastima funkcionalne genomike, toksikogenomike i biomarkera.

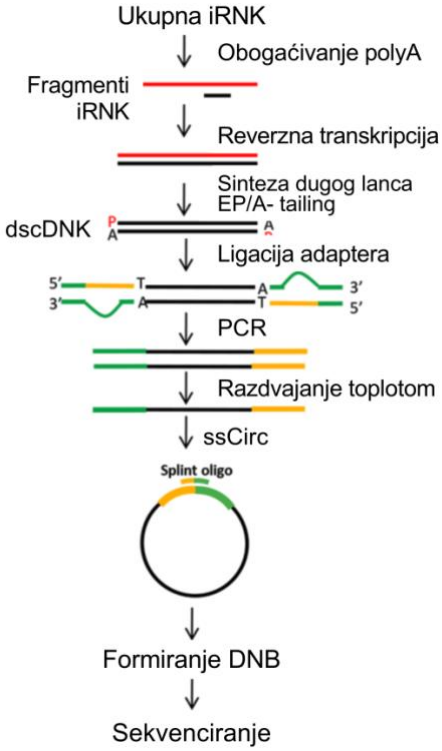
4.18.1. Priprema uzoraka za sekvenciranje iRNK

U cilju utvrđivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e na globalnu ekspresiju gena, uzorci koji su sadržali ukupnu RNK izolovanu na način opisan u poglavlju 4.17.1. su poslati u kompaniju BGI Europe (Varšava, Poljska) na RNA-Seq i dalju analizu. Za svaku tretiranu grupu i kontrolu poslati su uzorci dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta, tako da je ukupan broj uzoraka iznosio 24: 12 uzoraka koji su dobijeni nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija PFOS-u (u daljem tekstu: PFOS uzorci) i 12 uzoraka koji su dobijeni nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija PFOA-i (u daljem tekstu: PFOA uzorci). Poslato je 17 μL ukupne RNK po uzorku.

Pre slanja uzoraka na sekvenciranje, izmerena je koncentracija RNK u svim uzorcima korišćenjem uređaja BioSpec-Nano. Srednja vrednost koncentracije RNK u PFOS uzorcima iznosila je 379,82 ± 9,91 ng/μL, dok je čistoća u odnosu na proteine (A_{260}/A_{280}) iznosila 2,02 ± 0,009. Srednja vrednost koncentracije RNK u PFOA uzorcima iznosila je 531,77 ng/μL ± 30,1, dok je odnos A_{260}/A_{280} bio 2,01 ± 0,004. U kompaniji BGI Europe su pre sekvenciranja dodatno procenjeni količina i integritet ukupne RNK korišćenjem uređaja Agilent 4150 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Uzorci RNK za sekvenciranje su razblaživani do zapremine od ~49 μL. Vrednost broja koji ukazuje na integritet RNK (engl. *RNA integrity number*, RIN) ukazala je na izuzetno visok kvalitet svih analiziranih uzoraka. Srednja vrednost RIN za PFOS uzorke iznosila je 9,29 ± 0,2, dok je srednja vrednost RIN za PFOA uzorke iznosila 9,25 ± 0,17. Pored RIN, korišćenjem uređaja Agilent 4150 Bioanalyzer dobijeni su i podaci o odnosu 28S/18S u svim analiziranim uzorcima. Srednja vrednost odnosa 28S/18S u PFOS uzorcima iznosila je 2,62 ± 0,09, dok je srednja vrednost odnosa 28S/18S u PFOA uzorcima iznosila 2,48 ± 0,17. Tabela sa navedenim parametrima kvaliteta RNK pojedinačnih sekvenciranih uzoraka data je u Prilogu 1.

4.18.2. Sekvenciranje iRNK primenom platforme DNBSEQ™

Sekvenciranje iRNK sprovedeno je korišćenjem platforme DNBSEQ™ (engl. *DNA Nanoball Sequencing*) koja je razvijena od strane ogranka kompanije BGI (Complete Genomics). Ovaj sistem sekvenciranja se sastoji od kombinacije tehnologije nanokuglica (engl. *DNA Nanoballs*), modifikovane reakcije PCR i metode proba-sidro (engl. *combinatorial Probe-Anchor Synthesis*). Tehnologija sekvenciranja podrazumeva umnožavanje delova molekula kDNK metodom PCR, gde nakon amplifikacije jednog fragmenta milijarde njegovih kopija ostaju povezane i formiraju strukturu koja se naziva nanokuglica. Ovakav princip umnožavanja se obezbeđuje postupkom pripreme smeše za sekvenciranje, odnosno formiranjem biblioteke restrikcionim endonukleazama i dobijanjem lepljivih krajeva, dodatkom industrijski konstruisanih adapternih sekvenci koje omogućavaju formiranje kružnog molekula od jednog jednolančanog fragmenta DNK i Phi29 DNK polimeraze za sintezu vezanih kopija kružne DNK (engl. *concatemer*) koji u procesu PCR replikacije postaju nanokuglice (slika 4.10).



Slika 4.10. Prikaz obrade molekula iRNK u postupku pripreme smeše za sekvenciranje pomoći platforme DNBSEQ™. Slika je preuzeta sa onlajn platforme Dr. Tom i modifikovana u programu BioRender (https://www.biorender.com). DNB – DNK nanokuglice (engl. *DNA Nanoballs*), dscDNK – komplementarna DNK, PCR – lančana reakcija polimeraze, ssCirc – kružni jednolančani molekul.

Identifikacija pojedinačnih sekvenci u smeši omogućena je upotrebom fluorescentno obeleženih sidro-proba, a čitav proces amplifikacije i detekcije se odigrava u okviru protočne ćelije (engl. *flow cell*) uređaja za sekvenciranje. Za potrebe ovog doktorskog projekta, dužina sekvenciranja je bila PE150 (engl. *paired-end*, 150 baza).

4.18.3. Filtracija podataka i analiza diferencijalno eksprimiranih gena

Rezultati postupka sekvenciranja su očitani fragmenti (engl. *reads*), a označavaju se kao sirova očitavanja (engl. *raw reads*) koja moraju proći proveru kvaliteta (engl. *Quality Control*, QC). Sirovi podaci sekvenciranja uobičajeno sadrže očitavanja niskog kvaliteta, kontaminaciju adapterima i visoke nivoe nepoznate baze N. Ova očitavanja moraju biti uklonjena pre analize podataka kako bi se osigurala pouzdanost rezultata. QC podrazumeva i filtriranje očitavanja prema pragovnoj vrednosti kvaliteta (engl. *Quality Score*), odnosno jačini signala koji potiče od pojedinačnih baza fragmenta. U ovom istraživanju, za sve sekvencirane uzorke dobijeno je u proseku 22,87 ± 0,10 miliona sirovih očitavanja. U postupku QC, sekvence su obrađene tako što su uklonjena sva očitavanja koja sadrže više od 5% N (prosečno 2,00 ± 0,032% za PFOS uzorke, odnosno 1,96 ± 0,028% za PFOA uzorke), adaptere (3,60 ± 0,34% za PFOS uzorke, odnosno 3,40 ± 0,33% za PFOA uzorke) i više od 20% baza sa kvalitetom manjim od 15 (0,19 ± 0,004% za PFOS uzorke, odnosno 0,19 ± 0,0032% za PFOA uzorke). Time je u proseku dobijeno 22,18 ± 0,07 miliona čistih očitavanja (engl. *clean reads*) i 6,65 ± 0,02 Gb čistih baza po PFOS uzorku, dok su slični brojevi dobijeni i za PFOA uzorke – prosečno 22,21 ± 0,08 miliona čistih očitavanja i 6,66 ± 0,02 Gb čistih baza. Ovi podaci ukazuju na visok kvalitet sekvenciranja, s obzirom da je odnos broja čistih očitavanja prema broju sirovih očitavanja iznosio u proseku 97,02 ± 0,18% za PFOS uzorke, odnosno 97,14 ± 0,18% za PFOA uzorke. Tabela sa navedenim podacima za svaki pojedinačni sekvencirani uzorak data je u Prilogu 2.

Poreklo i/ili pozicija očitavanja se određuje informatičkim pristupom poravnanja (engl. *alignment*) poređenjem sa odabranim referentnim genomom (ili transkriptomom) ili konkretnom genskom sekvencom. QC poravnanja sprovodi se utvrđivanjem udela očitavanja kojima je uspešno određeno poreklo, odnosno pozicija (engl. *mapping rate*) i načina raspodele u genomu (engl. *distribution of reads*). U slučaju RNA-Seq, neophodna je analiza kvantifikacije gena koja u osnovi obuhvata grupisanje gena koji imaju sličan nivo ekspresije ili se eksprimiraju po sličnom principu, koji imaju zajedničke regulatore i one kojima je nivo ekspresije promenjen. U ovom istraživanju, za poravnanje čistih očitavanja

na referentni genom korišćen je softver HISAT (vrsta: *Homo sapiens*; izvor: NCBI; verzija referentnog genoma: GRCh38.p14, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000001405.40/), dok je za poravnanje na referentne gene korišćen softver Bowtie2. Stopa ukupnog poravnanja na referentni genom kretala se od 97,57 – 98,89% za PFOS uzorke (srednja vrednost 97,60 ± 0,13%), odnosno od 98,55 – 99,01% za PFOA uzorke (srednja vrednost 98,79 ± 0,13%), dok se stopa jedinstvenog poravnanja na referentni genom kretala od 88,12 – 90,38% za PFOS uzorke (srednja vrednost 89,54 ± 0,17%), odnosno od 88,84 – 90,32% za PFOA uzorke (srednja vrednost 89,53 ± 0,13%). Stopa ukupnog poravnanja na referentne gene kretala se od 83,77 – 88,01% za PFOS uzorke (srednja vrednost 85,98 ± 0,34%), odnosno od 84,67 – 88,33% za PFOA uzorke (srednja vrednost 86,36 ± 0,34%), dok se stopa jedinstvenog poravnanja na referentne gene kretala od 79,80 – 83,37% za PFOS uzorke (srednja vrednost 81,74 ± 0,29%), odnosno od 80,75 – 83,70% za PFOA uzorke (srednja vrednost 81,98 ± 0,30%). Tabela sa navedenim podacima za svaki pojedinačni sekvencirani uzorak data je u Prilogu 3.

Kod uzoraka dobrog kvaliteta i sa dovoljnom količinom sekvenciranih podataka očitavanja su ravnomerno raspoređena u različitim regionima transkripta. Slike koje prikazuju distribuciju očitavanja duž transkripata za svaki pojedinačni sekvencirani uzorak date su u Prilogu 4. Nadalje, kod uzoraka dobrog kvaliteta i sa dovoljnim brojem sekvenciranih podataka, većina transkripata je potpuno pokrivena. Na osnovu rezultata poravnanja, pokrivenost transkripata za svaki uzorak u ovom istraživanju prikazana je u Prilogu 5. Pored toga, analiza zasićenja sekvenciranja može, do izvesne mere, da pokaže da li je količina sekvenciranih podataka zadovoljavajuća spram potreba projekta. Sa porastom obima sekvenciranja (broja očitavanja), proporcionalno raste i broj detektovanih gena. Kada sekvenciranje dostigne određeni prag, stopa rasta broja detektovanih gena se izravnava, što ukazuje da je njihov broj dostigao zasićenje (saturaciju). U tom trenutku smatra se da je obim sekvenciranja adekvatan. S tim u vezi, Prilog 6 sadrži slike koje prikazuju udeo detektovanih gena za svaki pojedinačni sekvencirani uzorak, izražen u procentima, spram broja čistih očitavanja, što odgovara obimu sekvenciranja uzorka. Ukupno je detektovano 18 048 gena.

Inicijalnu analizu DEG-ova je uradila kompanija BGI Europe primenom metode DESeq2 (Love i sar., 2014), dok je dodatna analiza sprovedena pomoću onlajn platforme Dr. Tom (BGI Genomics, https://www.bgi.com/global/service/dr-tom). DEG-ovi su pohranjeni u Dr. Tom, odakle su povučeni za potrebe funkcionalne anotacije, gde se kroz analize obogaćivanja (engl. *gene enrichment analysis*) određuje njihova biološka uloga i

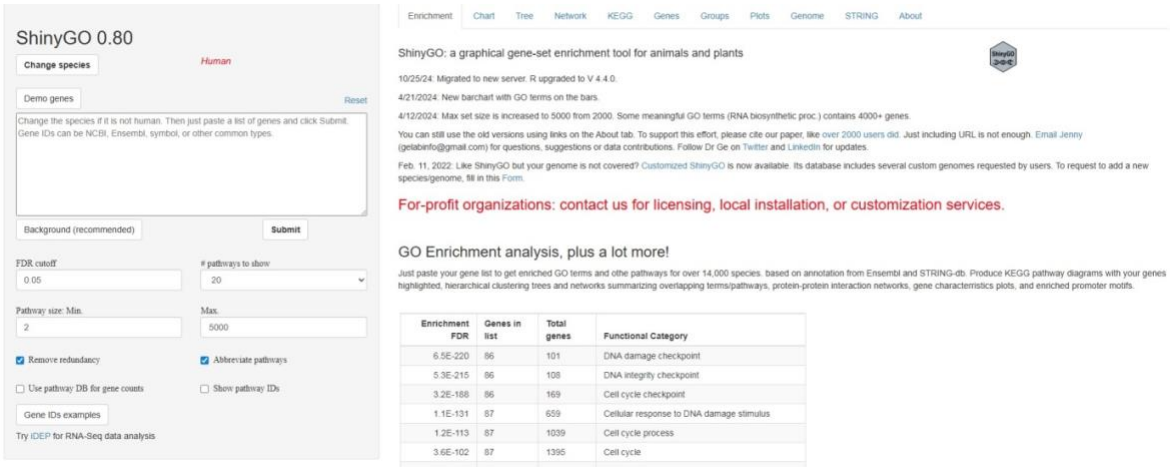
biomolekulske interakcije. Za potrebe analiza, DEG-ovi su odabrani prema pragovnim vrednostima statističkih parametara FDR < 0,05 (engl. *false discovery rate*) i |log2FC| ≥ 1. Svi procesi obrade podataka dobijenih sekvenciranjem su informatički zavisni i umnogome se oslanjaju na matematičke algoritme bioinformatičkih alata.

4.19. Identifikacija molekulskih funkcija i bioloških procesa u EA.hy926 ćelijama korišćenjem alata ShinyGO

Identifikacija molekulskih funkcija i bioloških procesa izvršena je pomoću alata ShinyGO 0.80 (https://bioinformatics.sdstate.edu/go80/) koji omogućava funkcionalnu interpretaciju velikih skupova gena dobijenih eksperimentalnim metodama, poput RNA-Seq. ShinyGO integriše različite izvore bioloških podataka i omogućava identifikaciju značajno obogaćenih funkcionalnih kategorija, kao što su biološki procesi, molekulske funkcije i ćelijske komponente definisane Gene Ontology (GO) terminima, kao i KEGG puteva. Unosom liste gena, dobija se uvid u najreprezentativnije funkcionalne grupe koje su statistički povezane sa analiziranim genima, što olakšava razumevanje njihovih uloga u ćelijskim procesima, regulatornim mehanizmima ili odgovorima na spoljašnje stimuluse. Ovaj alat se široko primenjuje u istraživanjima iz oblasti funkcionalne genomike, molekularne biologije i biomedicine.

U cilju utvrđivanja promena u molekulskim funkcijama i biološkim procesima nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e korišćen je onlajn alat ShinyGO. U tu svrhu, korišćeni su podaci o DEG-ovima dobijeni sa onlajn platforme Dr. Tom. Informacije o DEG-ovima unete su u polje “Lista gena” (engl. *Demo genes*) za svaku od odabranih koncentracija PFOS-a, odnosno PFOA-e. U narednom koraku, podešeni su parametri tako da je broj gena bio najmanje 2, a najviše 5000, dok je broj puteva za prikaz podešen na 20. Postoje i opcije za uklanjanje redundantnosti (engl. *Remove redundancy*) radi veće preglednosti, kao i za skraćivanje naziva puteva (engl. *Abbreviate pathways*), čime se omogućava sažetiji prikaz rezultata u tabelama ili grafikonima. Program automatski predlaže skup pozadinskih gena (engl. *Background genes*), koji se koristi kao referentni okvir za procenu statističke značajnosti obogaćenosti funkcionalnih kategorija. Ovaj skup se formira na osnovu izabrane vrste i dostupnih anotacija u relevantnim bazama podataka, čime se obezbeđuje validnost i pouzdanost dobijenih rezultata. ShinyGO je povezan sa platformom iDEP (engl. *Integrated Differential*

Expression and Pathway Analysis), koja omogućava proširenu analizu podataka dobijenih iz RNA-Seq, što doprinosi preciznijem tumačenju rezultata. Nakon podešavanja svih željenih parametara, analiza se pokreće opcijom „Predaj“ (engl. *Submit*), pri čemu je omogućen izbor različitih baza podataka za interpretaciju rezultata (slika 4.11).



Slika 4.11. Prozor u onlajn alatu ShinyGO 0.80 u kom su analizirani biološki procesi i molekulske funkcije na osnovu dobijenih diferencijalno eksprimiranih gena.

Po završetku analize, izabrana je opcija “Baza bioloških puteva” (engl. *Pathway database*), u okviru koje su izabrane kategorije “GO biološki procesi” (engl. *GO Biological Process*) i “GO molekulske funkcije” (engl. *GO Molecular Function*). U novom prozoru rezultati su smatrani statistički značajnim kada je FDR < 0,05.

4.20. Modelovanje referentnih koncentracija

Određivanje BMC-a korišćenjem BMC modelovanja predstavlja kvantitativni pristup za procenu toksičnih efekata hemikalija zasnovan na podacima koji su zavisni od koncentracije ispitivane hemikalije. Za razliku od tradicionalnih metoda koje se oslanjaju na određivanje pragova efekta (npr. NOAEL i LOAEL), BMC modelovanje koristi matematičke modele za opisivanje odnosa između koncentracije supstance i biološkog odgovora, čime je omogućeno preciznije određivanje koncentracije pri kojoj se javlja određeni nivo promena, tzv. referentni odgovor (engl. *benchmark response*, BMR), što je najčešće 10% u odnosu na kontrolu. Pored vrednosti BMC-a, modelovanjem se dobijaju i vrednosti za BMCL i BMCU. Ova metoda se koristi u toksikogenomskoj analizi, *in vitro* testovima i regulatornoj toksikologiji za identifikaciju najosetljivijih biomarkera i procenu

rizika. Rezultati BMC modelovanja doprinose boljem razumevanju odnosa doza-efekat i omogućavaju uporedivost efekata između različitih hemikalija i eksperimentalnih sistema.

U cilju utvrđivanja BMC-ova nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e korišćen je onlajn alat BMDExpress v3.20.0106 (https://github.com/auerbachs/BMDExpress-3). Sa platforme Dr. Tom preuzeti su normalizovani brojevi očitavanja (engl. *normalized read counts*, NRC), koji su u programu RStudio filtrirani kako bi se uklonili geni bez očitanih vrednosti i oni sa NRC < 1. Preostali podaci transformisani su u log2, a potom analizirani Williams-ovim testom trenda (engl. *Williams' trend test*) u programu BMDExpress uz 500 permutacija, prag promene ekspresije 1,5 puta i nivo značajnosti $p < 0,05$, radi izdvajanja gena koji pokazuju koncentraciono-specifičan odgovor. Podaci dobijeni nakon Williams-ovog testa trenda dalje su modelovani pomoću onlajn alata EPA BMDS (https://bmdsonline.epa.gov) sa BMR-om postavljenim na jednu standardnu devijaciju i izborom najboljeg modela za BMC, BMCL i BMCU pri $p < 0,05$. Na kraju su isključeni geni čiji je BMC veći od najviše korišćene koncentracije, kao i geni kod kojih je odnos BMCU/BMCL > 40.

4.21. Toksikokinetičko modelovanje zasnovano na fiziologiji čoveka

Fiziološki zasnovano toksikokinetičko modelovanje predstavlja matematički pristup u toksikologiji i farmakokinetici koji koristi anatomske i fiziološke karakteristike organizma za simulaciju kretanja lekova i hemikalija kroz ljudski organizam. PBTK modelovanje je naročito korisno za procenu izloženosti hemikalijama, procenu rizika u različitim populacijama, kao i za ekstrapolaciju rezultata dobijenih u *in vitro* eksperimentalnim modelima na čoveka (Cohen Hubal i sar., 2019; Chen i sar., 2023).

4.21.1. Izračunavanje ekvivalentne doze za čoveka za perfluorooktansulfonat

Distribucija PFOS-a po tkivima i organima procenjivana je korišćenjem onlajn alata OPERA (open-source QSAR; https://ntp.niehs.nih.gov/go/opera), koji obuhvata skup otvorenih QSAR/QSPR (engl. *Quantitative Structure–Property Relationship*) modela za predviđanje fizičko-hemijskih svojstava, bioakumulacije i ADME parametara velikog broja hemijskih supstanci. OPERA predviđanja su integrisana u CompTox Chemistry Dashboard Nacionalnog centra za računarsku toksikologiju U.S. EPA (engl. *U.S. EPA's National Center for Computational Toxicology*, https://comptox.epa.gov/dashboard/), dok su

hemijske supstance standardizovane kroz bazu DSSTox u vidu hemijskih identifikatora (npr. CAS RN, InChI, SMILES).

Za toksikokinetičko modelovanje primenjen je višedelni PBTK model iz R paketa *httk* (U.S. EPA), korišćenjem funkcije *solve_pbtk*. Model eksplicitno obuhvata creva, arterijsku i vensku krv, pluća, jetru i bubrege (sa „ostatkom tela") i omogućava predviđanje Css i maksimalnih koncentracija u tkivima (Cmax) nakon oralne ili intravenske izloženosti, uz simulaciju fiziologije kod ljudi.

Parametri doze su podešeni pristupom reverzne dozimetrije kako bi se izračunala vrednost HED-a, za odraslu osobu prosečne telesne mase (tm) 85 kg, izražena u μg PFOS-a/kg tm/dan. S obzirom na ograničenja softvera GastroPlus™ opisana u poglavlju 4.21.2., za potrebe simulacije PFOS-a korišćen je vremenski interval od dve godine, kako bi se osiguralo da su simulacije za obe supstance sprovedene pri istim uslovima. IVIVE je urađen polazeći od BMC-ova dobijenih u eksperimentima sprovedenim u uslovima *in vitro*, na endotelnoj ćelijskoj liniji EA.hy926. Odgovarajuće doze su tražene tako da model reprodukuje ciljnu koncentraciju u plazmi (C_target).

Toksikokinetički parametri PFOS-a izračunati su pomoću softvera ADMETlab 3.0 (https://admetlab3.scbdd.com/) i SwissADME (http://www.swissadme.ch/). Dobijeni parametri su nakon toga korišćeni u okviru modela za predviđanje HED vrednosti, što je omogućilo detaljnije razumevanje biološkog ponašanja PFOS-a na molekulskom nivou.

4.21.2. Izračunavanje ekvivalentne doze za čoveka za perfluorooktansku kiselinu

Za izračunavanje HED-a za PFOA-u primenjen je višedelni PBTK model zasnovan na ranije objavljenim radovima (Loccisano i sar., 2011; Loccisano i sar., 2013; Fàbrega i sar., 2014). Toksikokinetika PFOA-e je kompleksna zbog dugog vremena poluživota, aktivnog transporta i bubrežne reapsorpcije posredovane transporterima, uz ograničene ili nepotpune *in vivo* podatke kod ljudi koji su neophodni za potpunu validaciju modela. U ovom istraživanju, model je kalibrisan i validiran poređenjem sa podacima iz otvorene kliničke studije oralne izloženosti PFOA-i (Elcombe i sar., 2011).

Simulacije su izvedene u softveru GastroPlus™ (verzija 9.9, SimulationsPlus Inc., SA). Ulazni parametri korišćeni sa postavljanje PBTK modela za PFOA prikazani su u tabeli 4.2. Molekulska struktura je generisana u softveru ChemDraw® (verzija 20.0, PerkinElmer Informatics, SAD), dok su pojedine fizičko-hemijske/ADME vrednosti procenjene pomoću

alata ADMET Predictor i dopunjene eksperimentalno određenom rastvorljivošću. Preostali parametri preuzeti su iz literature i/ili izračunati u GastroPlus™.

Tabela 4.2. Ulazni parametri u PBTK modelu za perfluorooktansku kiselinu.

Parametri	**Vrednosti**	**Izvor**
Molekulska težina (g/mol)	414,07	ADMET Predictor
log D (pH 7,4)	1,158	ADMET Predictor
pKa	1,3 (kiselina)	ADMET Predictor
Permeabilnost jejunuma kod čoveka ($\times 10^{-4}$ cm/s)	4,16	ADMET Predictor
Doze (mg)	100, 300, 750	(Elcombe i sar., 2011)
Rastvorljivost u vodi na 37 ˚C (mg/mL)	9,03	Eksperimentalno određeno
Prosečno vreme precipitacije (s)	900	GastroPlus™ podrazumevana vrednost
Koeficijent difuzije ($\times 10^{-5}$ cm^2/s)	0,88	GastroPlus™ izračunata vrednost
Gustina čestica supstance (g/mL)	1,2	GastroPlus™ podrazumevana vrednost
Efektivni poluprečnik čestice (μm)	25	GastroPlus™ podrazumevana vrednost
Faktor oblika	4,00	GastroPlus™ podrazumevana vrednost
Odnos koncentracije krv/plazma	0,88	ADMET Predictor
Procenat nevezanog oblika u plazmi (%)	0,02	ADMET Predictor
Klirens, CL (mL/min/kg)	0,0002	(Dourson i Gadagbui, 2021)
Volumen distribucije, V_c (L)	12,994	GastroPlus™ izračunata vrednost
Poluvreme eliminacije (h)	9004,973	GastroPlus™ izračunata vrednost
Vreme simulacije (h)	16 000	GastroPlus™ izračunata vrednost

Toksikokinetika PFOA-e do danas nije u potpunosti istražena, dok dostupna literatura ukazuje na neusaglašenosti i varijacije u prijavljenim rezultatima. Prethodne studije su ukazale na produženo poluvreme eliminacije koje se kreće od 6 meseci do ≥1,5 godine (Dourson i Gadagbui, 2021), što otežava direktno određivanje ravnotežne koncentracije u plazmi (Css) tokom dugotrajne ponovljene izloženosti u ograničenom vremenskom prozoru simulacije. U ovoj doktorskoj disertaciji, usled softverskih ograničenja nije bilo moguće praćenje kinetike PFOA-e duže od 16000 h, odnosno dve godine, a dobijene vrednosti HED-ova izračunate su za osobu telesne mase 85 kg, izraženu u μg PFOA-e/kg tm/dan. Kako bi se prevazišlo ovo ograničenje, u modelu je izvršeno prilagođavanje stope eliminacije, tako što je poluvreme smanjeno, uz istovremeno održavanje vrednosti unutar realnih raspona prijavljenih u prethodnim istraživanjima, te je

na taj način procena Css sprovedena na osnovu asimptotskog približavanja krive koncentracija–vreme.

Validacija modela je sprovedena poređenjem simuliranih profila sa kliničkim podacima za tri oralne doze kapsula PFOA-e (100, 300 i 750 mg) prikazane u tabeli 4.3. Izvršena je analiza osetljivosti parametara (engl. *Parameter Sensitivity Analysis*, PSA) u cilju identifikacije ključnih parametara sa najvećim uticajem na ishode toksikokinetičkog profila. Ispitano je da li farmaceutski oblik doziranja i prisustvo hrane u gastrointestinalnom traktu utiču na toksikokinetički profil PFOA-e. Model je inicijalno postavljen korišćenjem formulacije kapsula sa trenutnim oslobađanjem, primenjene u kliničkoj studiji Elcombe i saradnika (2011), nakon čega je izvršena zamena farmaceutskog oblika rastvorom u cilju procene potencijalnog uticaja farmaceutskog oblika na simulirani toksikokinetički profil PFOA-e.

Tabela 4.3. Podaci iz studije Elcombe i saradnika (2011).

Forma doze	Doza	Dodatni podaci
p.o. kapsule	100 mg	Bez unosa hrane, dva muška i jedan ženski pacijent, prosečna starost 62 godine
p.o. kapsule	300 mg	Bez unosa hrane, dva muška i jedan ženski pacijent, prosečna starost 61 godina
p.o. kapsule	750 mg	Bez unosa hrane, dva muška i jedan ženski pacijent, prosečna starost 65 godina

Razvijeni PBTK model pokazao je dobro slaganje sa kliničkim *in vivo* podacima (Prilog 7). Rezultati PSA ukazuju da su maksimalna koncentracija PFOA-e u plazmi (Cmax), površina ispod krive koncentracija–vreme od 0 do t (AUC(0–t)) i maksimalna koncentracija PFOA-e u jetri veoma osetljive na varijacije u bubrežnom klirensu, nevezanoj frakciji PFOA-e u plazmi i koeficijentu raspodele u masnom tkivu (Prilog 8). Nisu uočene statistički značajne razlike u toksikokinetičkom profilu PFOA-e između kapsula i rastvora, kao ni između stanja natašte i nakon obroka (Prilog 9).

Validirani model je potom korišćen u reverznoj dozimetriji radi procene HED-ova. Kao ciljana koncentracija u plazmi (C_target) uzete su bioaktivne koncentracije (BMC-ovi) dobijene u eksperimentima sprovedenim u uslovima *in vitro*, na endotelnoj ćelijskoj liniji EA.hy926. Ulazna doza je iterativno podešavana sve dok simulirana koncentracija u plazmi (C_plazma) nije dostigla ili premašila ciljanu koncentraciju (C_target), odnosno BMC.

4.22. Izračunavanje odnosa bioaktivne doze i izloženosti

U cilju procene potencijalnog rizika izloženosti PFOS-u i PFOA-i, dobijene vrednosti HED-ova integrisane su sa podacima o izloženosti različitih populacija primenom metrike BER. U tu svrhu korišćeni su podaci o izloženosti opštih (engl. *general*, G) i profesionalno izloženih populacija (engl. *occupational*, O), preuzeti iz dostupne literature za PFOS (Prilog 10) i PFOA-u (Prilog 11). Navedeni podaci su, primenom pristupa reverzne dozimetrije i odgovarajućih PBTK modela opisanih u prethodnim poglavljima (4.21.1. i 4.21.2), transformisani u HED-ove izražene u μg/kg tm/dan.

Za izračunavanje BER-ova korišćene su referentne vrednosti HED-ova dobijene iz transkriptomskih podataka na nivou svih analiziranih gena. Kao centralna mera uzeta je vrednost P50, dok je kao konzervativniji pristup korišćen i 5. percentil (P5), koji predstavlja donju granicu distribucije HED-ova i odražava najosetljivije transkriptomske odgovore. BER je izračunat kao odnos između referentnih vrednosti HED-a (P50 ili P5) i procenjene izloženosti populacije:

$$BER = HED_{ref} / HED_{pop}$$

gde HED_{ref} predstavlja P50 ili P5 vrednosti HED-a za sve gene, dok HED_{pop} označava procenjenu dnevnu izloženost u posmatranoj populaciji.

Ovakav pristup omogućava kvantitativno poređenje biološki aktivnih doza sa realnim nivoima izloženosti, pri čemu niže vrednosti BER-ova ukazuju na manju marginu izloženosti i potencijalno veći rizik. Posebno, vrednosti BER ≤ 1 ukazuju na preklapanje između biološki aktivnih i realnih nivoa izloženosti, dok vrednosti u opsegu 1–100, iako veće od 1, i dalje mogu ukazivati na potencijalnu zabrinutost u proceni rizika.

4.23. Statistička analiza

Apikalni podaci dobijeni nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e predstavljeni su kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (engl. *standard error of mean*, SEM) iz 3–4 nezavisna biološka eksperimenta. Razlike između grupa procenjivane su primenom jednosmerne analize varijanse (engl. *one-way ANOVA*) u programu Prism8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, SAD), nakon čega je sproveden Dunnett-ov post-hoc test (engl. *Dunnett's multiple comparison post-hoc test*) za poređenje sa kontrolnom grupom. Vrednost $p < 0,05$

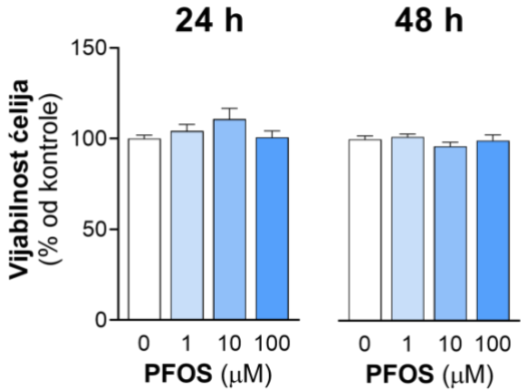
smatrana je statistički značajnom. Statističko testiranje hipoteza primenjeno je isključivo na apikalne krajnje ishode, dok su transkriptomski odgovori analizirani primenom BMC modelovanja i kriterijuma koncentracija–odgovor, umesto višestrukog testiranja zasnovanog na p-vrednostima.

5. REZULTATI

5.1. Efekti kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu

5.1.1. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na vijabilnost EA.hy926 ćelija

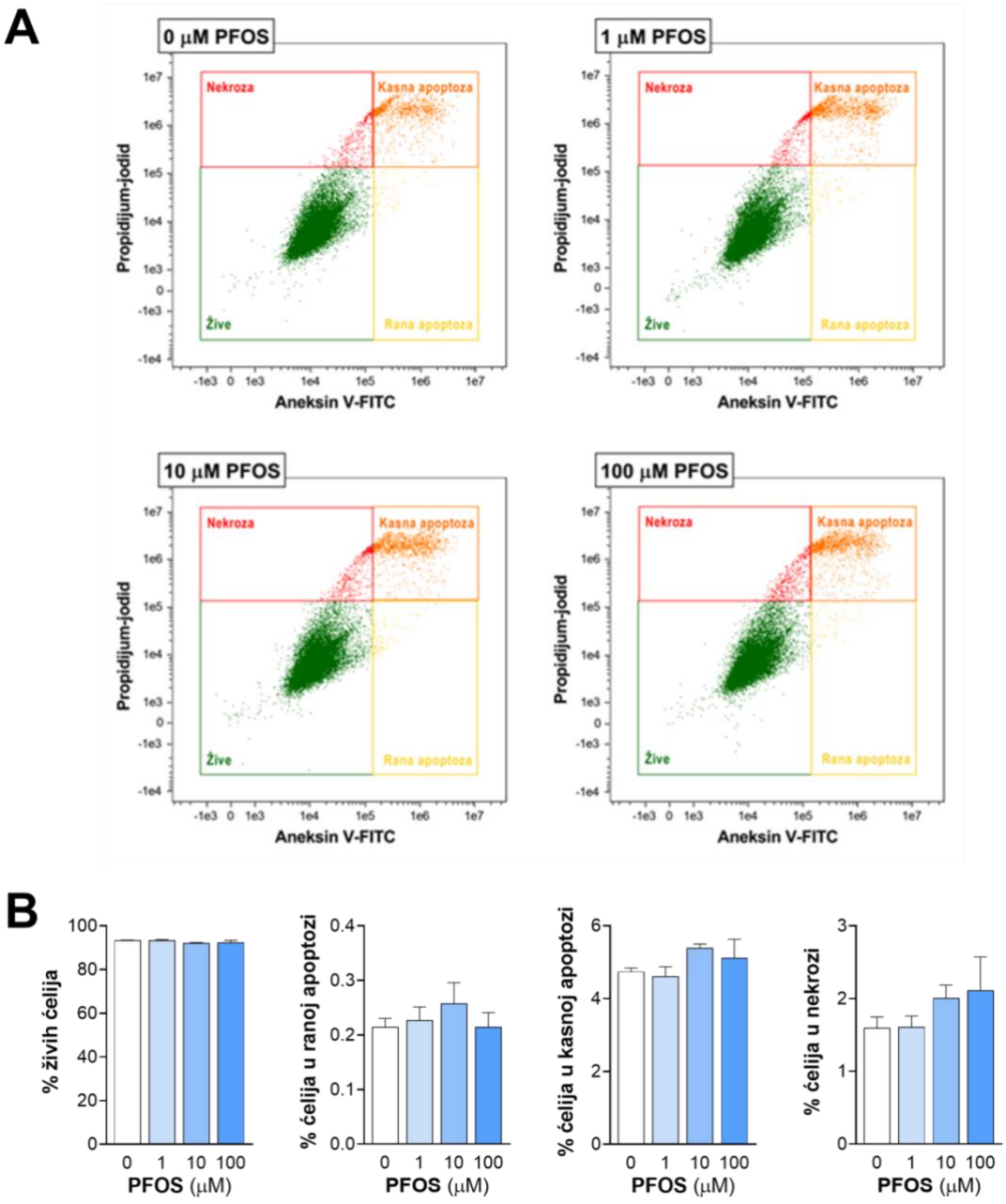
U cilju ispitivanja uticaja kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOS-u na vijabilnost ćelija korišćen je test sa bojom alamarBlue™. Analiza je pokazala da izlaganje odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a u trajanju od 24 i 48 h ne utiče na vijabilnost EA.hy926 ćelija (slika 5.1.1).



Slika 5.1.1. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na vijabilnost ćelija. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOS) u trajanju od 24 h i 48 h, nakon čega je određivana vijabilnost ćelija testom sa bojom alamarBlue™. Dobijene vrednosti su predstavljene kao procenat vijabilnosti u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOS (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

5.1.2. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na broj EA.hy926 ćelija u apoptozi i nekrozi

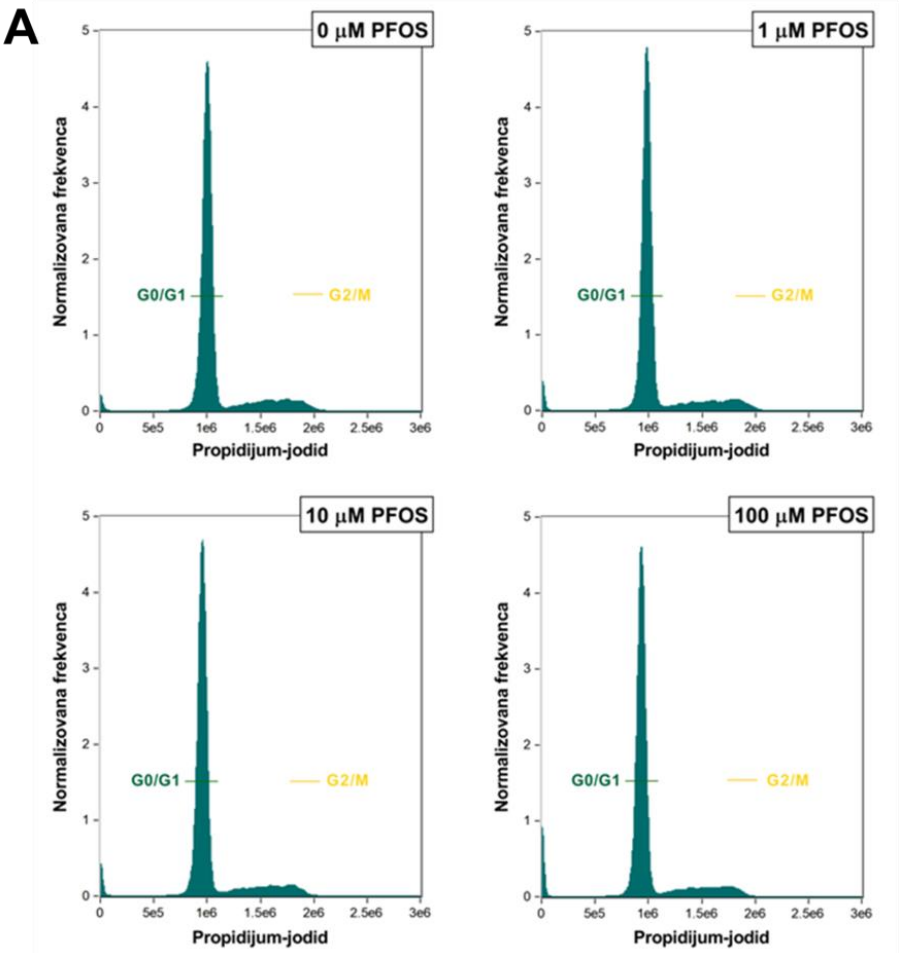
Dalje je ispitan uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOS-u na broj ćelija u apoptozi i nekrozi pomoću aneksina V-FITC i PI-a na protočnom citometru. Analiza dobijenih rezultata je pokazala da izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a u trajanju od 48 h ne utiče značajno na broj živih ćelija, broj ćelija u ranoj apoptozi, kasnoj apoptozi i nekrozi. Pored toga, zapaža se da je najveći procenat živih ćelija (preko 93%), dok je procenat ćelija u različitim fazama apoptoze i u nekrozi značajno manji (slika 5.1.2A i B).

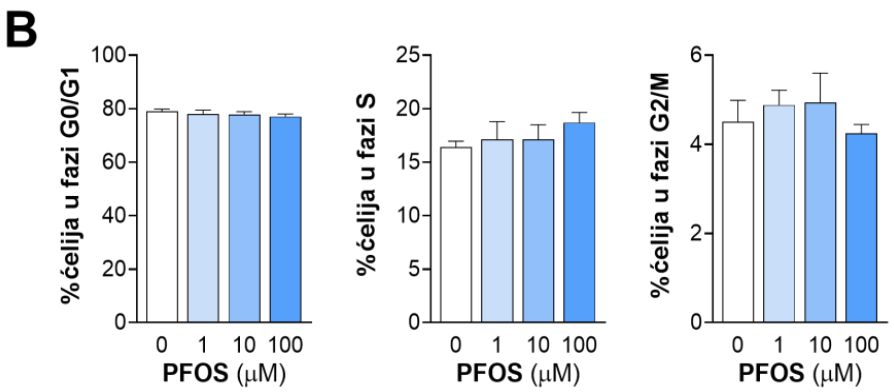


Slika 5.1.2. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na broj ćelija u apoptozi i nekrozi. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOS) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivan udeo ćelija u apoptozi i nekrozi metodom protočne citometrije korišćenjem aneksina V-FITC i PI-a. **(A)** Reprezentativni dvojno rasuti dijagrami prikazuju distribuciju ćelija u četiri jasno definisana kvadranta: donji levi – žive ćelije (aneksin V-FITC$^-$/PI$^-$); donji desni – ćelije u ranim fazama apoptoze (aneksin V-FITC$^+$/PI$^-$); gornji desni – ćelije u kasnim fazama apoptoze (aneksin V-FITC$^+$/PI$^+$); gornji levi – ćelije u nekrozi (aneksin V-FITC$^-$/PI$^+$). **(B)** Dobijene vrednosti su predstavljene kao procenat ćelija u određenom kvadrantu, odnosno kao procenat živih ćelija, ćelija u ranoj apoptozi, kasnoj apoptozi i nekrozi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

5.1.3. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na ćelijski ciklus u EA.hy926 ćelijama

U narednom koraku je ispitan uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOS-u na ćelijski ciklus metodom protočne citometrije korišćenjem PI-a. Analiza dobijenih rezultata je pokazala da nema značajnih razlika u fazama ćelijskog ciklusa između kontrolne grupe ćelija i ćelija koje su tokom 48 h izlagane odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a (slika 5.1.3A i B). U svim eksperimentalnim grupama, najveći procenat ćelija nalazi se u fazi G0/G1 (77,05–79,08%), dok je udeo ćelija u fazama S i G2/M znatno manji i kreće se u rasponu od 16,42–18,71% i 4,24–4,94%, redom.

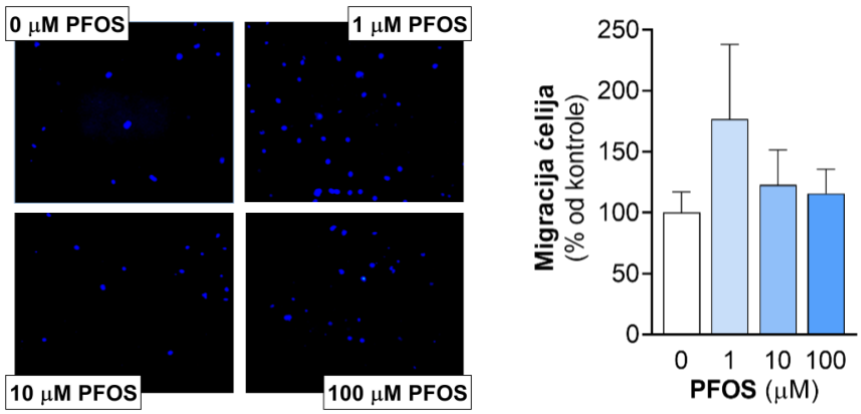




Slika 5.1.3. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na ćelijski ciklus. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOS) u trajanju od 48 h, nakon čega su određivane faze ćelijskog ciklusa metodom protočne citometrije nakon bojenja PI-om. **(A)** Reprezentativni histogrami prikazuju dva jasno definisana regiona: levi – ćelije u fazi G0/G1; desni – ćelije u fazi G2/M. Ćelije u fazi S su identifikovane između dva regiona. **(B)** Dobijene vrednosti su predstavljene kao procenat ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa, odnosno kao procenat ćelija u fazama G0/G1, S i G2/M. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

5.1.4. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na migraciju EA.hy926 ćelija

Pomoću Transwell® sistema (prečnik pora 8 μm) zatim je ispitano da li kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOS-u utiče na migraciju endotelnih ćelija u uslovima *in vitro*.



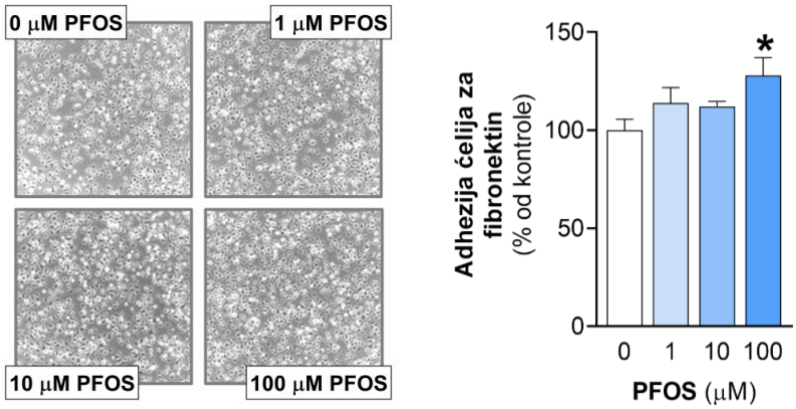
Slika 5.1.4. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na migraciju ćelija. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOS) u trajanju od 48 h, nakon čega je ispitivana migracija endotelnih ćelija pomoću modifikovane

Boyden Chamber tehnike u Transwell® sistemu (prečnik pora 8 μm). Prikazane su reprezentativne fotografije sa fluorescentnog mikroskopa. Srednja vrednost broja ćelija koje su migrirale kroz poroznu polikarbonatnu membranu Transwell® sistema dobijena je iz 10–15 nasumično odabranih mikroskopskih polja po grupi, a dobijene vrednosti su zatim predstavljene kao procenat ćelija koje su migrirale u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOS (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

Dobijeni rezultati su pokazali da izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a u trajanju od 48 h ne dovodi do značajnih promena u migraciji ćelija u odnosu na kontrolnu grupu (slika 5.1.4).

5.1.5. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na adheziju EA.hy926 ćelija za ekstracelularni matriks

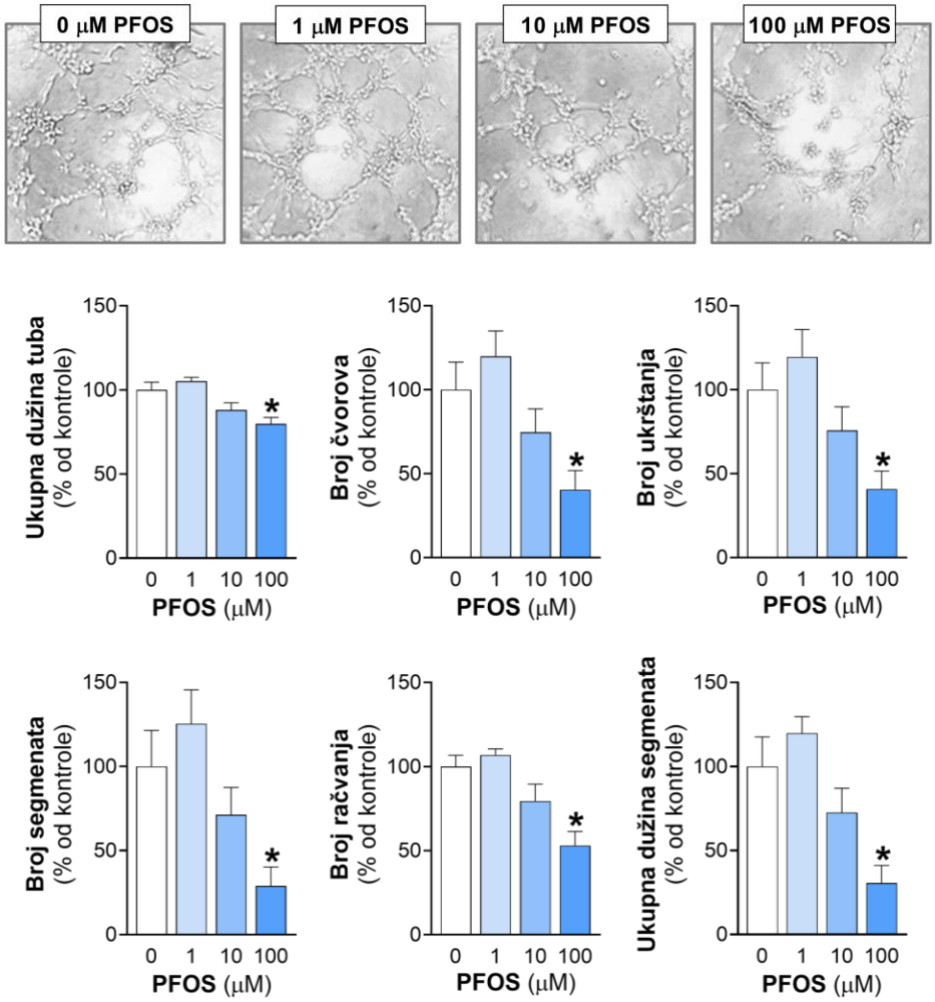
U narednom koraku ispitan je uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOS-u na adheziju ćelija za ECM. Utvrđena je značajno povećana adhezija ćelija za fibronektin nakon izlaganja 100 μM PFOS-u u trajanju od 48 h, i to za ~28% u odnosu na kontrolu, dok ćelije izlagane 1 i 10 μM PFOS-u nisu pokazale značajnije promene u adheziji za fibronektin (slika 5.1.5).



Slika 5.1.5. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na adheziju ćelija za ekstracelularni matriks. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOS) u trajanju od 48 h, nakon čega je ispitivana adhezija ćelija za fibronektin. Prikazane su reprezentativne fotografije sa svetlosnog mikroskopa. Broj vezanih ćelija za ECM određivan je testom sa bojom SRB. Dobijene vrednosti su predstavljene kao procenat vezanih ćelija za fibronektin u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOS (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja. *$p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

5.1.6. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na angiogenezu EA.hy926 ćelija

Uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOS-u na formiranje endotelnih tubula u uslovima *in vitro* ispitan je korišćenjem trodimenzionalnog gelastog matriksa Cultrex BME bez prisustva faktora rasta. Morfometrijska analiza sprovedena je korišćenjem alata Angiogenesis Analyzer u sklopu programa NIH Image J koji omogućava dobijanje kvantitativnih podataka za dvadeset parametara angiogeneze. Za potrebe statističke analize odabrano je šest najrelevantnijih parametara: ukupna dužina tuba, broj čvorova, broj ukrštanja, broj segmenata, ukupna dužina segmenata i ukupna dužina račvanja.



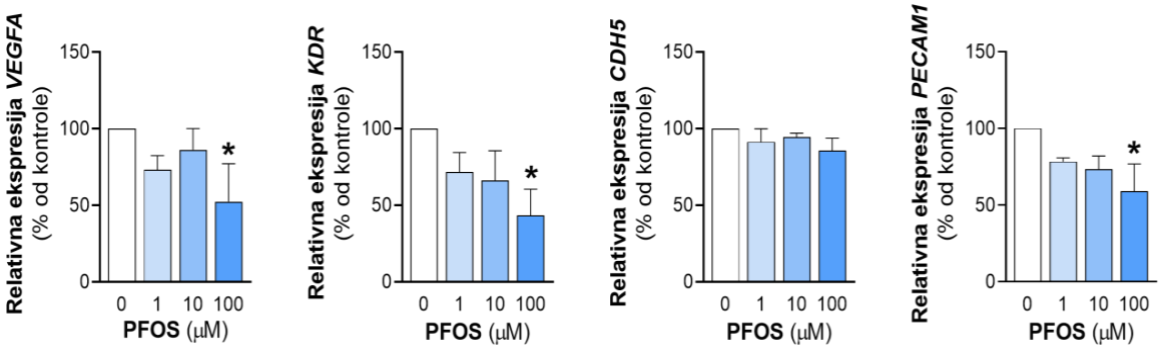
Slika 5.1.6. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na angiogenezu u uslovima *in vitro*. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOS) u trajanju od 48 h, nakon čega je ispitivano formiranje endotelnih tubula u uslovima *in vitro* korišćenjem trodimenzionalnog matriksa Cultrex BME u trajanju od 8 h. Prikazane su reprezentativne fotografije sa svetlosnog mikroskopa. Morfometrijska analiza je urađena korišćenjem alata Angiogenesis Analyzer u sklopu programa NIH Image J. Dobijene vrednosti su

predstavljene kao procenat odgovorajućeg parametra angiogeneze u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOS (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja. *p < 0,05 statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

Analiza navedenih parametara je ukazala na smanjeno formiranje endotelnih tubula nakon izlaganja ćelija 100 μM PFOS-u u trajanju od 48 h. Detaljnije, ukupna dužina tuba je smanjena za 20%, broj čvorova za 60%, broj ukrštanja za ~60%, broj segmenata za 71%, ukupna dužina račvanja za 47%, a ukupna dužina segmenata za 70% u odnosu na kontrolnu grupu (slika 5.1.6).

5.1.7. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na relativnu ekspresiju gena za odabrane proteine uključene u regulaciju angiogeneze u EA.hy926 ćelijama

S obzirom na to da su prethodni rezultati pokazali smanjenu sposobnost EA.hy926 ćelija da formiraju endotelne tube nakon kratkotrajnog izlaganja 100 μM PFOS-u, u narednom koraku je metodom RT-qPCR ispitana relativna ekspresija gena za odabrane proteine uključene u regulaciju angiogeneze: VEGF-A (kodiran genom *VEGFA*), VEGFR-2 (kodiran genom *KDR*), VE-kadherin (kodiran genom *CDH5*) i PECAM-1 (kodiran genom *PECAM1*).

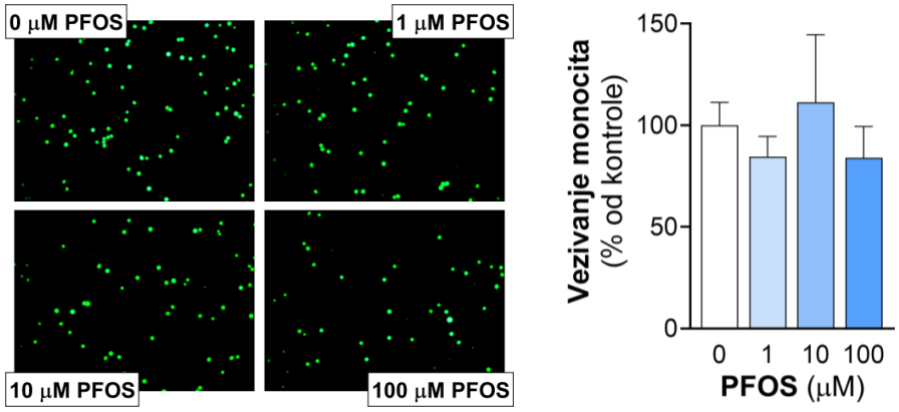


Slika 5.1.7. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na relativnu ekspresiju gena za proteine uključene u regulaciju angiogeneze. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOS) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivan nivo iRNK za *VEGFA*, *KDR*, *CDH5* i *PECAM1* metodom RT-qPCR. Dobijene vrednosti su predstavljene kao relativna ekspresija odgovarajućeg gena u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOS (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 3 ponavljanja. *p < 0,05 statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

Rezultati su pokazali da je nakon 48 h izlaganja EA.hy926 ćelija 100 μM PFOS-u značajno smanjena relativna ekspresija *VEGFA*, *KDR* i *PECAM1* u odnosu na kontrolu, i to za 48%, 57% i 41%, redom, dok smanjenje relativne ekspresije *CDH5* od 15% u odnosu na kontrolu nije dostiglo nivo statističke značajnosti. Ostale ispitivane koncentracije PFOS-a nisu pokazale efekat na relativnu ekspresiju ispitivanih gena (slika 5.1.7).

5.1.8. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na vezivanje monocita za monosloj EA.hy926 ćelija

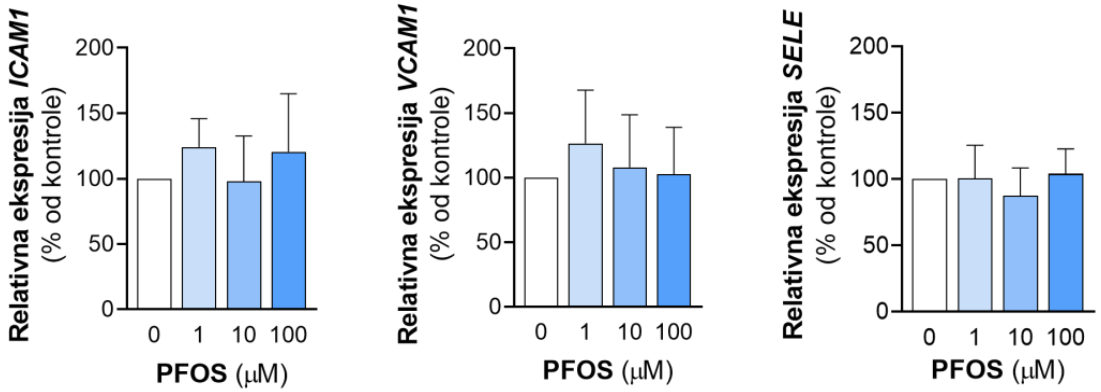
Zatim je ispitan uticaj 48-časovnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOS-u na vezivanje fluorescentno obeleženih monocita za površinu endotelnih ćelija u uslovima *in vitro*. U poređenju sa kontrolom, nije uočena statistički značajna promena u vezivanju U937 monocita za monosloj EA.hy926 ćelija ni pri jednoj od ispitivanih koncentracija PFOS-a (slika 5.1.8).



Slika 5.1.8. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na vezivanje monocita za monosloj endotelnih ćelija. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOS) u trajanju od 48 h, nakon čega je ispitivano vezivanje fluorescentno obeleženih U937 monocita za monosloj endotelnih ćelija. Prikazane su reprezentativne fotografije sa fluorescentnog mikroskopa. Srednja vrednost broja vezanih U937 monocita dobijena je iz 10–15 nasumično odabranih mikroskopskih polja po grupi, a dobijene vrednosti su zatim predstavljene kao procenat vezanih monocita za monosloj endotelnih ćelija u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOS (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

5.1.9. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule u EA.hy926 ćelijama

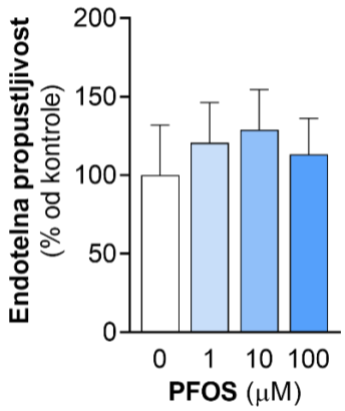
Relativna ekspresija gena za ICAM-1 (*ICAM1*), VCAM-1 (*VCAM1*) i E-selektin (*SELE*), CAM-ova koji učestvuju u vezivanju monocita za monosloj endotelnih ćelija, određena je metodom RT-qPCR nakon izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 µM PFOS-u u trajanju od 48 h. U poređenju sa kontrolom, nije utvrđena statistički značajna promena ekspresije nijednog od ispitivanih gena pri bilo kojoj koncentraciji (slika 5.1.9).



Slika 5.1.9. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 µM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 µM PFOS) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivan nivo iRNK za *ICAM1*, *VCAM1* i *SELE* metodom RT-qPCR. Dobijene vrednosti su predstavljene kao relativna ekspresija odgovarajućeg gena u odnosu na kontrolu – 0 µM PFOS (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

5.1.10. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na propustljivost monosloja EA.hy926 ćelija

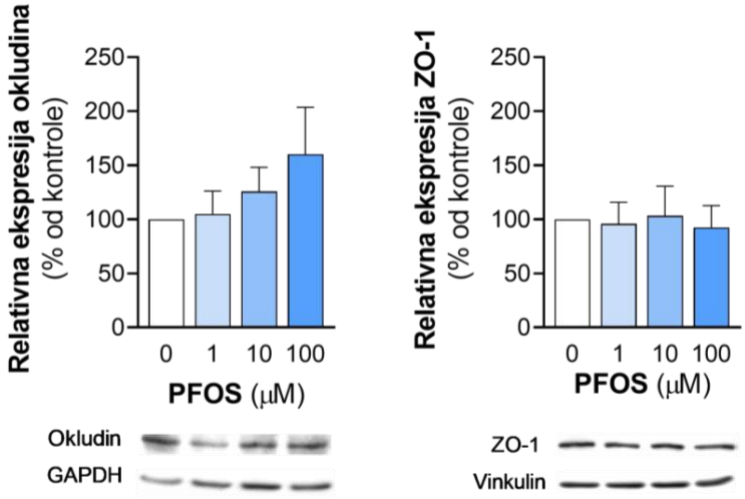
Uzimajući u obzir ključnu ulogu endotela u formiranju polupropustljive barijere za razmenu hranljivih materija, gasova i ćelija, ispitana je endotelna propustljivost nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 µM PFOS-u. Merenje je sprovedeno u Transwell® sistemu sa dva odeljka korišćenjem fluorescentno obeleženog FITC-dekstrana (FD40) kao paracelularnog markera. Analiza dobijenih rezultata je pokazala da izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a u trajanju od 48 h ne utiče značajno na propustljivost endotelne barijere (slika 5.1.10).



Slika 5.1.10. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na propustljivost endotela. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOS) u trajanju od 48 h, nakon čega je ispitivana propustljivost monosloja endotelnih ćelija korišćenjem FD40 u Transwell® sistemu (prečnik pora 0,4 μm). Endotelna propustljivost je izračunata kao prosečna promena fluorescentnog signala u donjem odeljku Transwell® ploče za 5 min tokom 120 min, a dobijene vrednosti su predstavljene kao procenat propustljivosti monosloja endotelnih ćelija u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOS (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

5.1.11. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na ekspresiju okludina i ZO-1 u EA.hy926 ćelijama

Potom je ispitan uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOS-u na ekspresiju dva proteina koji ulaze u sastav TJ: okludina i ZO-1.



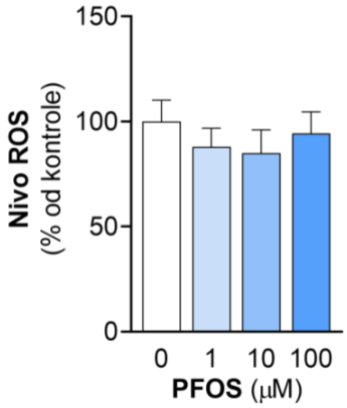
Slika 5.1.11. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na ekspresiju okludina i ZO-1. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO;

0 μM PFOS) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivana ekspresija okludina i ZO-1 metodom Western blot. Prikazane su reprezentativne Western blot slike. Kvantifikacija rezultata je urađena u programu NIH Image J. Dobijene vrednosti za svaki uzorak su normalizovane na ekspresiju GAPDH-a (za okludin) ili vinkulina (za ZO-1) u datom uzorku, a rezultati su predstavljeni relativno u odnosu na normalizovanu ekspresiju ispitivanog proteina u kontroli – 0 μM PFOS (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

U skladu sa prethodnim, ovi rezultati su pokazali da izlaganje EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a u trajanju od 48 h ne utiče značajno na ekspresiju okludina i ZO-1 (slika 5.1.11).

5.1.12. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na nivo reaktivnih vrsta kiseonika u EA.hy926 ćelijama

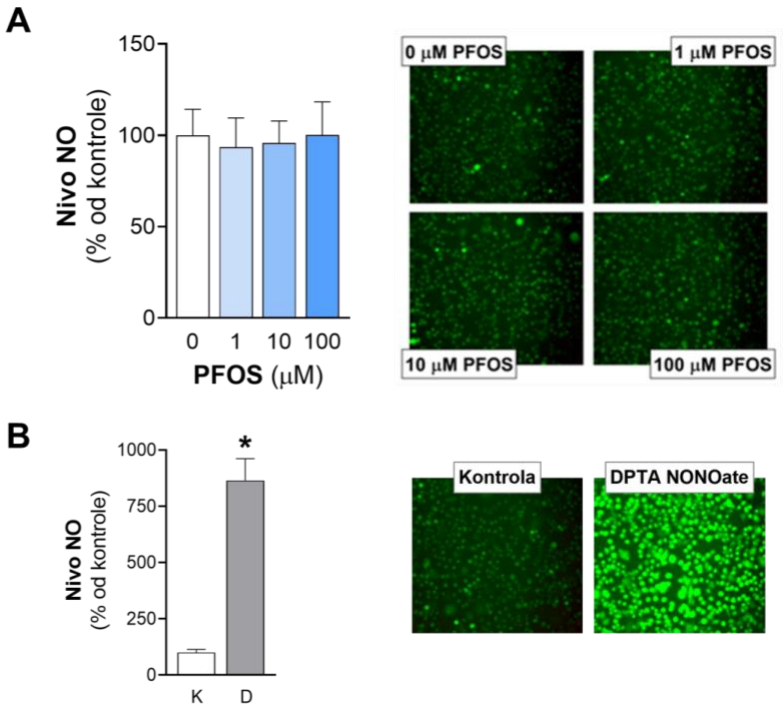
Uzimajući u obzir važnu ulogu koju ROS imaju u vaskulaturi, u sledećem koraku je ispitan uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOS-u na stvaranje ROS-a korišćenjem reagensa H_2DCFDA. Rezultati su pokazali da izlaganje ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a u trajanju od 48 h ne dovodi do značajnih razlika u nivou ROS-a u odnosu na kontrolu (slika 5.1.12).



Slika 5.1.12. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na nivo reaktivnih vrsta kiseonika. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOS) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivan nivo ROS-a korišćenjem reagensa H_2DCFDA. Dobijene vrednosti su predstavljene kao procenat nivoa ROS-a u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOS (100%). Normalizacija dobijenih rezultata na broj ćelija urađena je pomoću testa sa bojom SRB. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

5.1.13. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na nivo azot-monoksida u EA.hy926 ćelijama

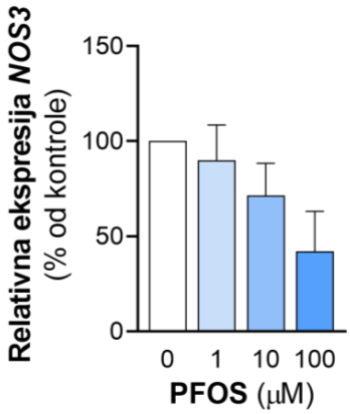
U narednom koraku ispitan je uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOS-u na stvaranje NO-a korišćenjem reagensa DAF-FM DA. Dobijeni rezultati su pokazali da izlaganje PFOS-u u trajanju od 48 h ne dovodi do značajnih razlika u nivou NO-a u endotelnim ćelijama (slika 5.1.13A). Važno je napomenuti da je DPTA NONOat, poznati donor NO-a, povećao produkciju NO-a za gotovo 800% u odnosu na nestimulisanu kontrolu i izazvao snažan fluorescentni signal u EA.hy926 ćelijama (slika 5.1.13B).



Slika 5.1.13. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na nivo azot-monoksida. (A) Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOS) u trajanju od 48 h, nakon čega je praćeno stvaranje NO-a pomoću fluorescentnog čitača mikroploča (grafički prikaz) i fluorescentnog mikroskopa (reprezentativne fotografije) korišćenjem reagensa DAF-FM DA. **(B)** Efekat DPTA NONOata (pozitivna kontrola) na stvaranje NO-a. Ćelije su prethodno inkubirane sa 2,5 μM DAF-FM DA tokom 15 min, nakon čega je dodat 100 μM DPTA NONOat u trajanju od 30 min. Stvaranje NO-a je praćeno pomoću fluorescentnog čitača mikroploča (grafički prikaz) i fluorescentnog mikroskopa (reprezentativne fotografije). K – kontrola; D – DPTA NONOat. **(A, B)** Dobijene vrednosti sa fluorescentnog čitača mikroploča su predstavljene kao procenat nivoa NO-a u odnosu na kontrolu (100%). Normalizacija dobijenih rezultata na broj ćelija urađena je pomoću testa sa bojom SRB. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja. *$p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

5.1.14. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na relativnu ekspresiju gena za endotelnu azot-monoksid sintazu u EA.hy926 ćelijama

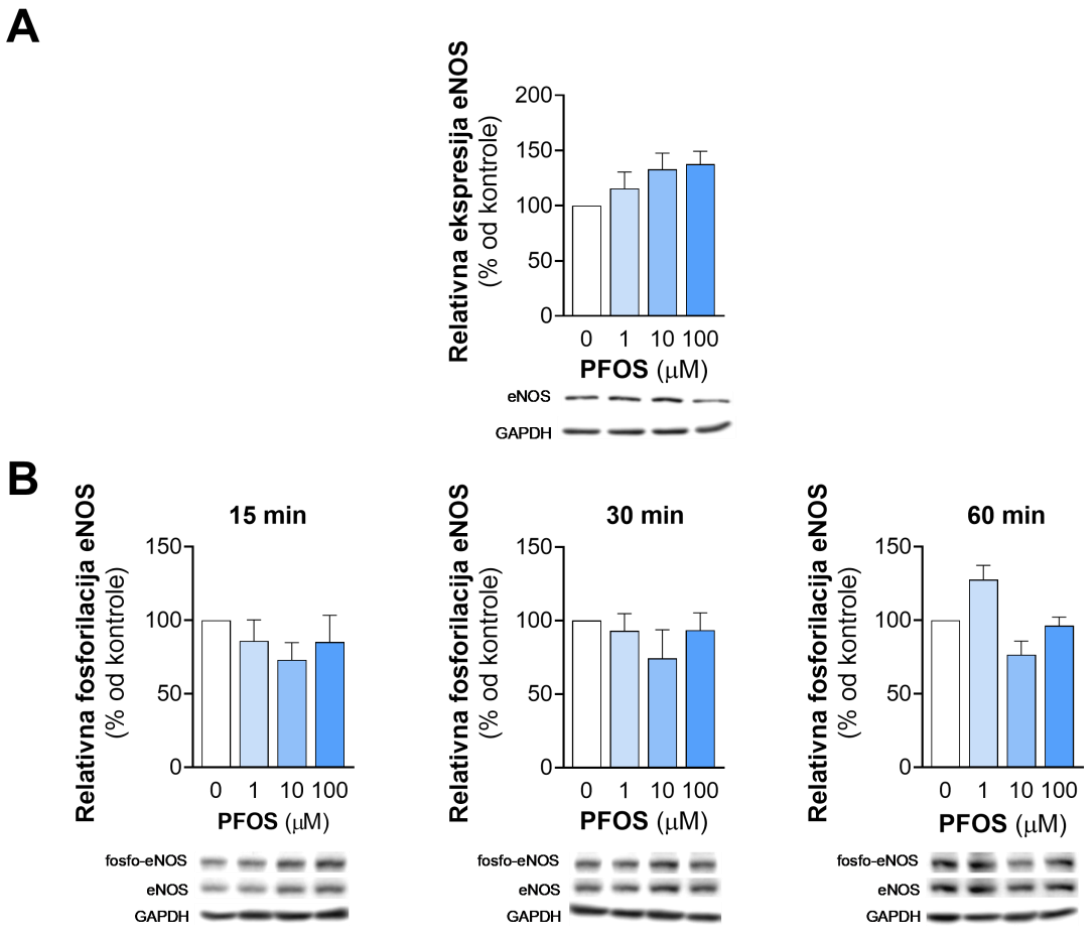
U svetlu gore prikazanih rezultata, u narednom koraku je metodom RT-qPCR ispitan uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a na relativnu ekspresiju gena za eNOS (kodiran genom *NOS3*). Rezultati su pokazali da je nakon 48 h došlo do izvesnog smanjenja nivoa iRNK za *NOS3* u grupi ćelija koje su izlagane 100 μM PFOS-u, i to za ~58% u odnosu na kontrolu, međutim ovaj rezultat nije dostigao nivo statističke značajnosti ($p = 0,088$) (slika 5.1.14.).



Slika 5.1.14. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na relativnu ekspresiju gena za endotelnu azot-monoksid sintazu. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOS) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivan nivo iRNK za *NOS3* metodom RT-qPCR. Dobijene vrednosti su predstavljene kao relativna ekspresija *NOS3* u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOS (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 3 ponavljanja.

5.1.15. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu na ekspresiju i fosforilaciju endotelne azot-monoksid sintaze u EA.hy926 ćelijama

Metodom Western blot praćen je uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOS-u na ekspresiju i fosforilaciju eNOS-a. U skladu sa prethodno navedenim rezultatima, nisu uočene statistički značajne razlike u ekspresiji eNOS-a nakon 48 h izlaganja (slika 5.1.15A), kao i fosforilaciji eNOS-a u odnosu na kontrolu nakon 15, 30 i 60 min izlaganja odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a (slika 5.1.15B).

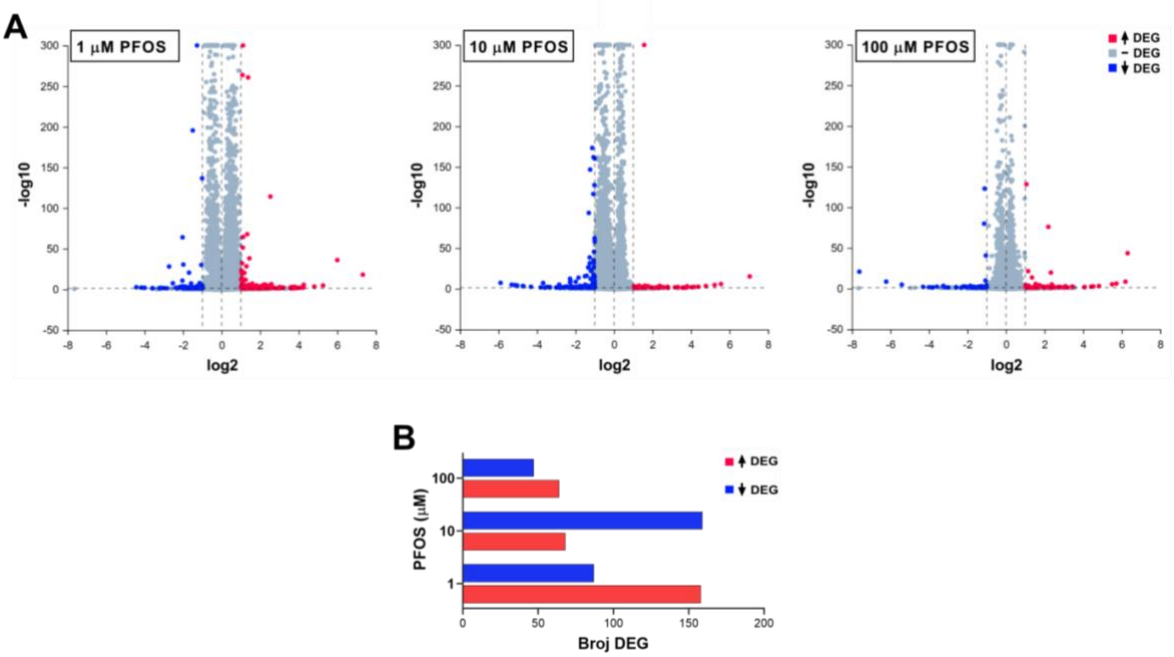


Slika 5.1.15. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na ekspresiju i fosforilaciju endotelne azot-monoksid sintaze. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOS) u trajanju od **(A)** 48 h ili **(B)** 15, 30 i 60 min, nakon čega je određivana **(A)** ekspresija ili **(B)** fosforilacija eNOS-a metodom Western blot. Prikazane su reprezentativne Western blot slike. Kvantifikacija rezultata je urađena u programu NIH Image J. Dobijene vrednosti za svaki uzorak su normalizovane na ekspresiju **(A)** GAPDH-a ili **(B)** eNOS-a u datom uzorku, a rezultati su predstavljeni relativno u odnosu na normalizovanu ekspresiju **(A)** eNOS-a ili **(B)** fosfo-eNOS-a u kontroli – 0 μM PFOS (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 3–4 ponavljanja.

5.1.16. Identifikacija diferencijalno eksprimiranih gena u EA.hy926 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu

Analizom transkriptoma identifikovani su DEG-ovi u EA.hy926 ćelijama nakon izlaganja 1, 10 i 100 μM PFOS-u u trajanju od 48 h. DEG-ovi su definisani kao geni sa najmanje dvostrukom promenom ekspresije u odnosu na kontrolu ($|\log2FC| \geq 1$) i Q-vrednošću $\leq 0,05$ (slika 5.1.16A). Zapaženo je da je broj DEG-ova varirao u zavisnosti od

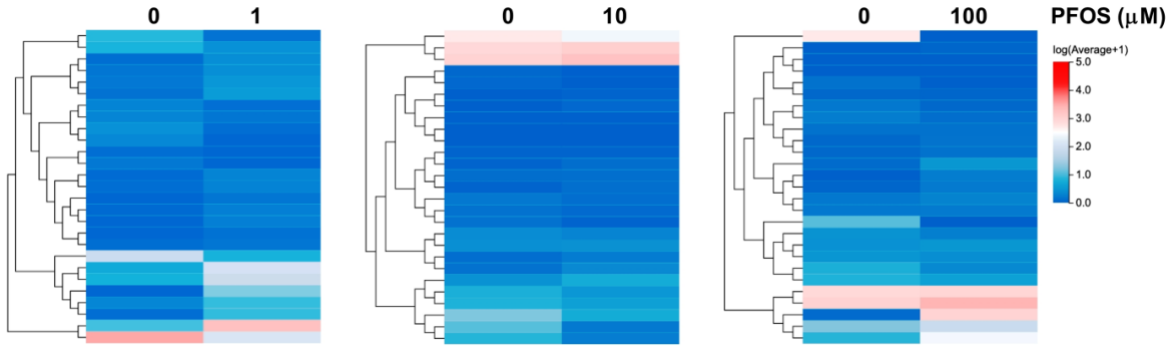
koncentracije PFOS-a. Tako je najviše DEG-ova zabeleženo pri najnižoj koncentraciji od 1 μM PFOS-a, ukupno 245, od čega je 158 gena sa povećanom, a 87 gena sa smanjenom ekspresijom. Nasuprot tome, izlaganje ćelija 10 μM PFOS-u i 100 μM PFOS-u rezultovalo je sa 227 DEG-ova (68 gena sa povećanom, 159 gena sa smanjenom ekspresijom) i 111 DEG-ova (64 gena sa povećanom, 47 gena sa smanjenom ekspresijom), redom (slika 5.1.16B).



Slika 5.1.16. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na globalnu ekspresiju gena. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOS) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivana globalna ekspresija gena sekvenciranjem iRNK primenom platforme DNBSEQ™. **(A)** Vulkanski dijagram globalne ekspresije iRNK i broj DEG-ova. X-osa prikazuje promenu ekspresije u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOS nakon log2 transformacije, dok y-osa prikazuje vrednost značajnosti (Q-vrednost) nakon transformacije u –log10. Statistički značajno povećano eksprimirani geni nakon 48 h izlaganja odabranoj koncentraciji PFOS-a označeni su crvenim tačkama, smanjeno eksprimirani geni su prikazani plavim tačkama, dok su geni bez statistički značajne promene ekspresije predstavljeni sivim tačkama. **(B)** X-osa prikazuje broj DEG-ova nakon 48 h izlaganja, a y-osa različite koncentracije PFOS-a. Za svaku koncentraciju, crveni stubići predstavljaju broj gena sa povećanom ekspresijom, dok plavi stubići predstavljaju broj gena sa smanjenom ekspresijom.

Na slici 5.1.17 prikazani su rezultati hijerarhijskog grupisanja transkripata pomoću toplotnih mapa (engl. *heatmaps*), koje omogućavaju vizuelni prikaz obrazaca ekspresije gena u kontrolnim i tretiranim uzorcima EA.hy926 ćelija izlaganih različitim

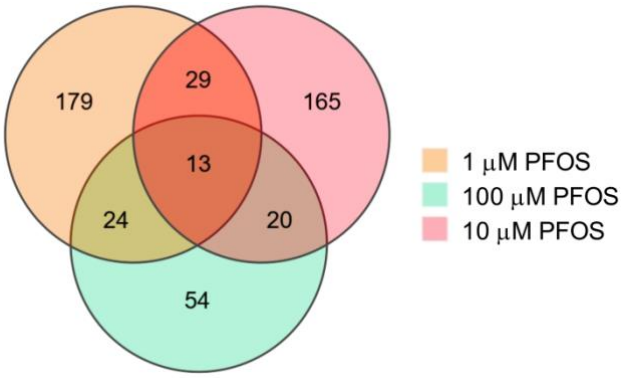
mikromolarnim koncentracijama PFOS-a. Prikazani podaci predstavljaju apsolutne nivoe ekspresije gena, dok hijerarhijsko grupisanje odražava sličnost profila ekspresije između pojedinačnih gena. Detaljnije, pri koncentraciji od 1 µM PFOS-a dominantne su nijanse plave boje, što ukazuje da većina analiziranih gena ima nizak do umeren nivo ekspresije, bez izraženih globalnih razlika u odnosu na kontrolne uzorke. Hijerarhijsko grupisanje identifikuje manje klastere gena sa sličnim obrascima ekspresije, ali bez jasne razlike između kontrolnih i tretiranih uzoraka. Pri koncentraciji od 10 µM PFOS-a i dalje dominiraju niži nivoi ekspresije, uz pojavu ograničenog broja gena sa višim vrednostima (svetlije ili crvenije nijanse). Ove promene su lokalizovane i odnose se na pojedinačne klastere gena, dok globalni profil ekspresije ostaje relativno sličan kontrolnim uzorcima. Pri koncentraciji od 100 µM PFOS-a uočava se nešto veći broj gena sa višim nivoima ekspresije u pojedinačnim klasterima, ali i dalje bez izraženog globalnog pomaka u ukupnom transkriptomskom profilu. Hijerarhijsko grupisanje ukazuje na postojanje lokalizovanih promena, dok većina gena zadržava nizak do umeren nivo ekspresije.



Slika 5.1.17. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na hijerarhijsko grupisanje transkripata. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 µM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 µM PFOS) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivana globalna ekspresija gena sekvenciranjem iRNK primenom platforme DNBSEQ™. Toplotne mape prikazuju apsolutne nivoe ekspresije gena (log[Average+1]) za kontrolne i tretirane uzorke po pojedinačnim koncentracijama PFOS-a. Analiza klastera (hijerarhijsko grupisanje) zasniva se na sličnosti profila ekspresije gena i omogućava identifikaciju grupa transkripata sa sličnim obrascima ekspresije. Intenzitet boje odražava nivo ekspresije: nijanse plave označavaju niže, a nijanse crvene više nivoe ekspresije, dok svetlije nijanse ukazuju na srednje vrednosti.

Slika 5.1.18 prikazuje broj jedinstvenih i zajedničkih DEG-ova nakon izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 µM PFOS-u u trajanju od 48 h. Najveći broj jedinstvenih DEG-ova identifikovan je pri koncentraciji PFOS-a od 1 µM (179 gena), nešto manje pri

koncentraciji od 10 μM (165 gena), dok je pri koncentraciji od 100 μM identifikovan najmanji broj jedinstvenih gena (54 gena). Broj zajedničkih promenjenih gena između grupa ćelija izlaganih 1 i 10 μM PFOS-u je 29, između 10 i 100 μM PFOS-a je 20, dok broj zajedničkih promenjenih gena između 1 i 100 μM PFOS-a iznosi 24. Ukupno je identifikovano 13 DEG-ova koji su zajednički za sve tri ispitivane koncentracije PFOS-a.



Slika 5.1.18. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu na broj jedinstvenih i zajedničkih diferencijalno eksprimiranih gena. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOS) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivana globalna ekspresija gena sekvenciranjem iRNK primenom platforme DNBSEQ™. Venov dijagram prikazuje DEG-ove za svaku pojedinačnu koncentraciju PFOS-a u poređenju sa kontrolom – 0 μM PFOS, pri čemu se ističe broj jedinstvenih i preklapajućih DEG-ova među navedenim koncentracijama PFOS-a.

U tabeli 5.1.1 su prikazani DEG-ovi sa najizraženijim povećanjem relativne ekspresije (najviše vrednosti log2 promene FC) nakon 48-časovnog izlaganja EA.hy926 ćelija različitim koncentracijama PFOS-a, u poređenju sa kontrolom. Pri izlaganju ćelija 1 μM PFOS-u, uočeno je izrazito povećanje ekspresije fuzionog transkripta *BIVM* (engl. *basic, immunoglobulin-like variable motif containing*)*–ERCC5* (engl. *excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5*), koji pokazuje najveću promenu među svim ispitivanim genima (~161 put u odnosu na kontrolu), što ukazuje na veoma snažan transkripcioni odgovor već pri najnižoj koncentraciji PFOS-a. Pored toga, značajno su povećane i ekspresije gena *ZNF117* (engl. *zinc finger protein 117*), *CCDC169* (engl. *chromosome 13 open reading frame 38*)*–SOHLH2* (engl. *spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2*), *TP53TG3F* (engl. *TP53 target 3 family member F*) i *TMEFF1* (engl. *transmembrane protein with EGF like and two follistatin like domains*

1), sa relativnim promenama ekspresije u rasponu od približno 19 do 38 puta u odnosu na kontrolu.

Tabela 5.1.1. Pet diferencijalno eksprimiranih gena sa najvećim povećanjem relativne ekspresije u EA.hy926 ćelijama nakon 48 h izlaganja perfluorooktansulfonatu (1, 10 i 100 μM), u poređenju sa kontrolom.

1 μM PFOS			
Gen	**log2FC**	**FC**	**FDR**
BIVM–ERCC5	7,33	161,02	$7{,}40 \times 10^{-19}$
ZNF117	5,26	38,42	$1{,}37 \times 10^{-05}$
CCDC169–SOHLH2	4,81	28,10	$2{,}68 \times 10^{-04}$
TP53TG3F	4,26	19,19	$1{,}99 \times 10^{-06}$
TMEFF1	4,25	18,97	$4{,}09 \times 10^{-03}$
10 μM PFOS			
Gen	**log2FC**	**FC**	**FDR**
STIMATE–MUSTN1	7,05	132,39	$7{,}29 \times 10^{-16}$
ATP5MF–PTCD1	5,55	47,01	$1{,}22 \times 10^{-06}$
TBCEL–TECTA	5,23	37,43	$1{,}80 \times 10^{-05}$
C4B	4,77	27,32	$3{,}38 \times 10^{-04}$
RGPD1	4,38	20,81	$2{,}35 \times 10^{-03}$
100 μM PFOS			
Gen	**log2FC**	**FC**	**FDR**
BIVM–ERCC5	6,20	73,52	$3{,}00 \times 10^{-09}$
TBCEL–TECTA	5,73	53,08	$6{,}00 \times 10^{-07}$
RGPD1	5,50	45,25	$4{,}35 \times 10^{-06}$
STIMATE–MUSTN1	4,82	28,25	$4{,}96 \times 10^{-04}$
ZNF117	4,42	21,41	$3{,}44 \times 10^{-03}$

Nakon izlaganja ćelija 10 μM PFOS-u, kao gen sa najizraženijim povećanjem ekspresije izdvaja se fuzioni transkript *STIMATE* (engl. *transmembrane protein 110*)–*MUSTN1* (engl. *musculoskeletal, embryonic nuclear protein 1*), za koji je pokazano da se eksprimira ~132 puta više u odnosu na kontrolu. Povećana ekspresija zabeležena je i za gene *ATP5MF* (engl. *ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit F2*)–*PTCD1* (engl. *pentatricopeptide repeat domain 1*) i *TBCEL* (engl. *tubulin-binding cofactor E-like*)–*TECTA* (engl. *tectorin alpha*), čija se relativna ekspresija povećala više od 35 puta u odnosu na kontrolu. Geni *C4B* (engl. *complement component 4B*) i *RGPD1* (engl. *RANBP2*

like and GRIP domain containing 1) takođe pokazuju značajno povećanje ekspresije, ali sa nešto nižim vrednostima FC. Pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji, 100 μM PFOS, ponovo se ističe gen *BIVM–ERCC5* kao najviše eksprimiran (FC = 73,52), iako je intenzitet promene manji nego pri 1 μM PFOS-u. Visoko povećane vrednosti ekspresije zabeležene su i za gene *TBCEL–TECTA*, *RGPD1* i *STIMATE–MUSTN1*, koji su zajednički za 10 μM i 100 μM PFOS, dok se *ZNF117*, nakon 1 μM PFOS-a, ponovo javlja među pet najviše eksprimiranih gena. Ukupno posmatrano, rezultati ukazuju na snažan i selektivan transkriptomski odgovor EA.hy926 ćelija na PFOS, sa ponavljanjem pojedinih snažno eksprimiranih gena kroz različite koncentracije, ali i sa izraženim koncentracionim razlikama u intenzitetu ekspresije.

U tabeli 5.1.2 su prikazani DEG-ovi sa najizraženijim smanjenjem relativne ekspresije (najniže vrednosti log2 promene FC) u EA.hy926 ćelijama nakon 48-časovnog izlaganja odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a, u poređenju sa kontrolom. Pri izlaganju ćelija 1 μM PFOS-u, uočeno je umereno, ali statistički značajno smanjenje ekspresije više gena. Najizraženija inhibicija zabeležena je za *RSC1A1* (engl. *regulator of solute carriers 1*) sa FC = 0,047, što ukazuje na približno dvadesetostruko smanjenje ekspresije u odnosu na kontrolu. Geni *RPA4* (engl. *replication protein A4*) i *NPW* (engl. *neuropeptide W*) pokazuju sličan stepen inhibicije (FC = 0,062), dok su *RNF157* (engl. *ring finger protein 157*) i *KRT36* (engl. *keratin 36*) manje, ali i dalje značajno inhibisani. Nakon izlaganja ćelija 10 μM PFOS-u, uočava se znatno izraženije smanjenje ekspresije pojedinih gena, kako po intenzitetu tako i po statističkoj značajnosti. Najjača inhibicija zabeležena je za *IFNAR2* (engl. *interferon alpha and beta receptor 2*)*–IL10RB* (engl. *interleukin 10 receptor subunit beta*) sa FC = 0,017, što ukazuje na približno šezdesetostruko smanjenje ekspresije u odnosu na kontrolu. Slično tome, značajno su smanjene ekspresije "*read-through*" transkripata *TNFAIP8L2* (engl. *tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 2*)*–SCNM1* (engl. *sodium channel modifier 1*) i *HSPE1* (engl. *heat shock 10kDa protein 1 [chaperonin 10]*)*–MOB4* (engl. *MOB family member 4, phocein*), kao i gena *TP53TG3* (engl. *TP53 target 3*) i *ZNF611* (engl. *zinc finger protein 611*), sa vrednostima FC ispod 0,04 (raspon smanjenja ekspresije u odnosu na kontrolu od ~35 do 26 puta). Pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji (100 μM PFOS), zabeležena je izrazito snažna inhibicija ekspresije pojedinih gena. Najizraženiji efekat uočen je za *EFNA4* (engl. *ephrin A4*)*–EFNA3* (engl. *ephrin A3*) sa FC = 0,005, što predstavlja više od 200 puta smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu. Značajno su inhibisani i *H4C12* (engl. *H4 clustered histone 12*) i *PHOSPHO2* (engl. *phosphatase, orphan 2*)*–KLHL23* (engl. *kelch-like 23*), kao i *TGIF2* (engl. *TGFB-*

induced factor homeobox 2)–*RAB5IF* (engl. *chromosome 20 open reading frame 24*) i *LILRB3* (engl. *leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 3*), iako sa nešto blažim intenzitetom. Ukupno posmatrano, rezultati ukazuju na jasan koncentraciono-zavisan supresivan efekat PFOS-a na gensku ekspresiju u EA.hy926 ćelijama, pri čemu se sa porastom koncentracije povećava i intenzitet i dubina inhibicije.

Tabela 5.1.2. Pet diferencijalno eksprimiranih gena sa najvećim smanjenjem relativne ekspresije u EA.hy926 ćelijama nakon 48 h izlaganja perfluorooktansulfonatu (1, 10 i 100 μM), u poređenju sa kontrolom.

1 μM PFOS			
Gen	**log2FC**	**FC**	**FDR**
RSC1A1	–4,43	0,047	$1{,}93 \times 10^{-03}$
RPA4	–4,00	0,062	$1{,}02 \times 10^{-02}$
NPW	–4,00	0,062	$1{,}02 \times 10^{-02}$
RNF157	–3,59	0,083	$3{,}45 \times 10^{-02}$
KRT36	–3,59	0,083	$3{,}52 \times 10^{-02}$
10 μM PFOS			
Gen	**log2FC**	**FC**	**FDR**
IFNAR2–IL10RB	–5,89	0,017	$4{,}47 \times 10^{-08}$
TNFAIP8L2–SCNM1	–5,16	0,028	$3{,}09 \times 10^{-05}$
HSPE1–MOB4	–5,03	0,031	$7{,}28 \times 10^{-05}$
TP53TG3	–4,74	0,037	$4{,}10 \times 10^{-04}$
ZNF611	–4,71	0,038	$4{,}94 \times 10^{-04}$
100 μM PFOS			
Gen	**log2FC**	**FC**	**FDR**
EFNA4–EFNA3	–7,61	0,005	$1{,}40 \times 10^{-21}$
H4C12	–6,22	0,013	$2{,}00 \times 10^{-09}$
PHOSPHO2–KLHL23	–5,41	0,024	$9{,}98 \times 10^{-06}$
TGIF2–RAB5IF	–4,30	0,051	$5{,}71 \times 10^{-03}$
LILRB3	–3,83	0,070	$3{,}00 \times 10^{-02}$

5.1.17. Identifikacija molekulskih funkcija povezanih sa diferencijalno eksprimiranim genima u EA.hy926 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu

Identifikacija molekulskih funkcija povezanih sa DEG-ovima u EA.hy926 ćelijama nakon izlaganja 1, 10 i 100 μM PFOS-u izvršena je korišćenjem online alata ShinyGO 0.80. Rezultati prikazani u tabeli 5.1.3 ukazuju na obrnuto koncentraciono-zavisne promene u obogaćenju molekulskih funkcija nakon 48 h izlaganja ćelija PFOS-u.

Tabela 5.1.3. Funkcionalna obogaćenja (GO Molekulske funkcije) diferencijalno eksprimiranih gena u EA.hy926 ćelijama nakon 48 h izlaganja perfluorooktansulfonatu (1, 10 i 100 μM).

1 μM PFOS			
GO Molekulske funkcije	**Broj gena**	**Geni signalnog puta**	**FDR**
Vezivanje jona kalcijuma	20	775	$5{,}3 \times 10^{-3}$

10 μM PFOS			
GO Molekulske funkcije	**Broj gena**	**Geni signalnog puta**	**FDR**
Aktivnost aril-sulfotransferaze	3	10	$3{,}3 \times 10^{-2}$

100 μM PFOS			
GO Molekulske funkcije	**Broj gena**	**Geni signalnog puta**	**FDR**
Aktivnost aril-sulfotransferaze	3	10	$1{,}4 \times 10^{-3}$

Detaljnije, pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji PFOS-a (1 μM) uočen je najveći odgovor na nivou genske ekspresije, sa ukupno 20 DEG-ova, koji su povezani sa 775 gena u okviru istog signalnog puta. Kao jedina molekulska funkcija identifikovano je vezivanje jona kalcijuma, uz statistički značajno obogaćenje (FDR = $5{,}3 \times 10^{-3}$). Nasuprot tome, pri višim koncentracijama PFOS-a (10 i 100 μM) detektovan je manji broj DEG-ova (po tri gena za svaku koncentraciju), ali je u oba slučaja obogaćena ista molekulska funkcija – aktivnost aril-sulfotransferaze. Statistička značajnost ovog obogaćenja bila je umerena pri 10 μM PFOS-u (FDR = $3{,}3 \times 10^{-2}$), dok je pri 100 μM PFOS-u bila izraženija (FDR = $1{,}4 \times 10^{-3}$).

5.1.18. Identifikacija bioloških procesa povezanih sa diferencijalno eksprimiranim genima u EA.hy926 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu

Kao i u slučaju molekulskih funkcija, identifikacija bioloških procesa povezanih sa DEG-ovima u EA.hy926 ćelijama nakon izlaganja 1, 10 i 100 μM PFOS-u izvršena je korišćenjem onlajn alata ShinyGO 0.80. Rezultati prikazani u tabeli 5.1.4 ukazuju da su značajno obogaćeni biološki procesi identifikovani nakon 48-časovnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1 i 100 μM PFOS-u, dok pri koncentraciji od 10 μM PFOS-a nisu detektovane statistički značajne promene na nivou obogaćenja bioloških procesa.

Tabela 5.1.4. Funkcionalna obogaćenja (GO Biološki procesi) diferencijalno eksprimiranih gena u EA.hy926 ćelijama nakon 48 h izlaganja perfluorooktansulfonatu (1, 10 i 100 μM).

1 μM PFOS			
GO Biološki procesi	**Broj gena**	**Geni signalnog puta**	**FDR**
Homofilna ćelijska adhezija putem adhezivnih molekula plazma membrane	9	172	$4{,}8 \times 10^{-2}$

100 μM PFOS			
GO Biološki procesi	**Broj gena**	**Geni signalnog puta**	**FDR**
Katabolizam etanola	3	12	$4{,}3 \times 10^{-3}$
Katabolizam primarnih alkohola	3	15	$6{,}4 \times 10^{-3}$
Metabolizam etanola	3	20	$1{,}1 \times 10^{-2}$
Metabolizam kateholamina	5	58	$1{,}7 \times 10^{-3}$
Metabolizam jedinjenja koja sadrže kateholnu grupu	5	58	$1{,}7 \times 10^{-3}$
Katabolizam organskih hidroksi jedinjenja	5	81	$4{,}3 \times 10^{-3}$
Ćelijski metabolizam biogenih amina	5	106	$1{,}1 \times 10^{-2}$
Metabolizam jedinjenja koja sadrže fenolnu grupu	5	115	$1{,}1 \times 10^{-2}$
Metabolizam amina	5	122	$1{,}3 \times 10^{-2}$

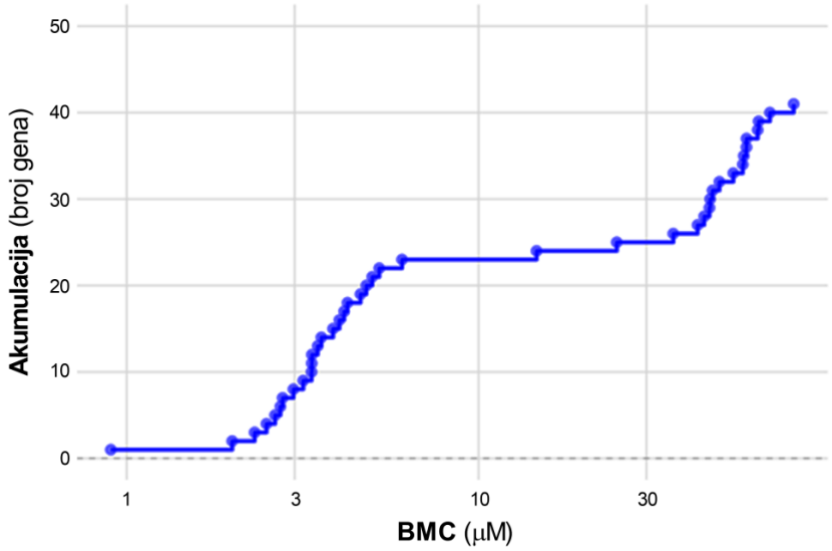
Detaljnije, pri 1 μM PFOS-u identifikovan je samo jedan značajno obogaćen biološki proces – homofilna ćelijska adhezija putem adhezivnih molekula plazma membrane. Nasuprot tome, pri 100 μM PFOS-u uočava se dominantno obogaćenje bioloških procesa povezanih sa metabolizmom i katabolizmom alkohola, amina i fenolnih jedinjenja. Značajni procesi uključuju katabolizam etanola, katabolizam primarnih alkohola, metabolizam

etanola, kao i više procesa vezanih za metabolizam kateholamina, biogenih amina i jedinjenja sa fenolnom ili kateholnom grupom. Zbirno, dok niska koncentracija PFOS-a utiče prvenstveno na adhezivne mehanizme, visoka koncentracija izaziva izražen metabolički odgovor.

5.1.19. Modelovanje referentnih koncentracija nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu

Vrednosti BMC-ova određene su preko log2 vrednosti NRC-ova dobijenih sekvenciranjem iRNK nakon izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 µM PFOS-u u trajanju od 48 h. Rezultati prikazani na slici 5.1.19. u vidu akumulacionog dijagrama ukazuju da se najveći porast broja gena sa niskim vrednostima BMC-a javlja u opsegu od približno 2–4 µM PFOS-a, što sugeriše da je u tom rasponu koncentracija prisutan najveći broj gena osetljivih na ispitivanu supstancu.

Detaljnije, zapaža se inicijalna faza u opsegu koncentracija do 2,5 µM PFOS-a, nakon čega sledi faza tzv. koordinisanog molekulskog odgovora (engl. *concerted molecular response*) u opsegu koncentracija od 2,5 do 4 µM PFOS-a, u okviru koje dolazi do aktivacije ~20 gena. Vrednosti između 4 i 20 µM PFOS-a karakteriše pojava efekta zasićenja (platoa), tokom kog se broj gena ne menja i iznosi ~25. Više vrednosti BMC-a, preko 30 µM PFOS-a, dovode do naknadnog povećanja broja gena, do ukupno 41.



Slika 5.1.19. Dijagram kumulativne raspodele diferencijalno eksprimiranih gena prema vrednostima referentnih koncentracija u EA.hy926 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 µM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO;

0 μM PFOS) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivana globalna ekspresija gena sekvenciranjem iRNK primenom platforme DNBSEQ™. Analiza BMC-ova na osnovu log2 vrednosti NRC-ova je sprovedena u programu BMDExpress v3.20.0106. Na x-osi je prikazana vrednost BMC-a (μM) na logaritamskoj skali, dok y-osa predstavlja kumulativan broj gena čije su vrednosti BMC-a jednake ili manje od odgovarajuće koncentracije. Svaka tačka na krivoj označava dodatni gen koji dostiže svoj granični odgovor na toj ili nižoj koncentraciji PFOS.

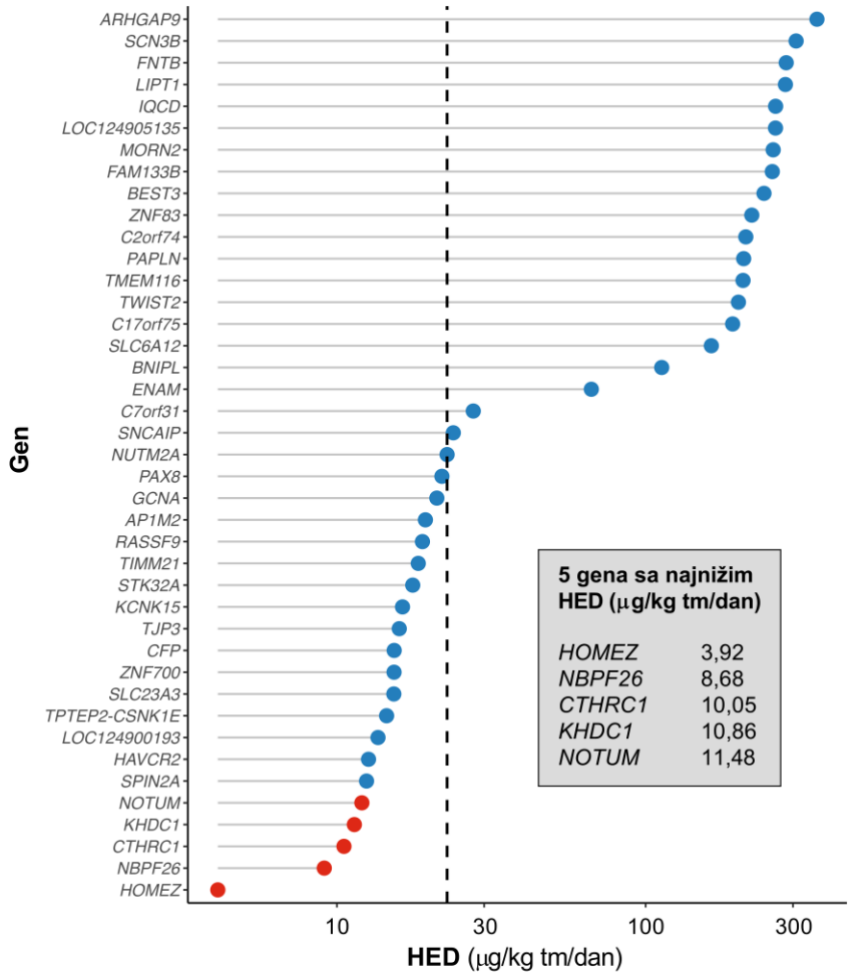
Tabela 5.1.5 prikazuje gene sa najnižim vrednostima BMC-ova, kao i pripadajućim granicama pouzdanosti BMCL i BMCU, dobijenim na osnovu transkriptomskog odgovora EA.hy926 ćelija nakon 48-časovnog izlaganja PFOS-u. Najnižu vrednost BMC-a pokazuje gen *HOMEZ* (engl. *homeobox and leucine zipper encoding*) (BMC = 0,90 μM), uz veoma nizak BMCL (0,027 μM), što ukazuje na visoku osetljivost ovog gena na PFOS i rani transkripcioni odgovor pri niskim koncentracijama ove supstance. Slede geni *NBPF26* (engl. *neuroblastoma breakpoint family member 26*) (BMC = 1,99 μM) i *CTHRC1* (engl. *collagen triple helix repeat containing 1*) (BMC = 2,31 μM), sa relativno uskim intervalima pouzdanosti. Geni *KHDC1* (engl. *KH domain containing 1*) i *NOTUM* (engl. *notum, palmitoleoyl-protein carboxylesterase*) imaju vrednosti BMC-ova u rasponu od ~2,5–2,6 μM, sa nešto širim BMCU-om, ali i dalje ukazuju na nisku pragovnu koncentraciju potrebnu za detekciju koncentraciono-zavisnih promena u ekspresiji. Ukupno posmatrano, ovi rezultati identifikuju skup najosetljivijih transkriptomskih markera odgovora EA.hy926 ćelija na PFOS, relevantnih za određivanje PoD-a.

Tabela 5.1.5. Pet gena sa najnižim vrednostima referentne koncentracije i pripadajućim granicama pouzdanosti (BMCL i BMCU), dobijeni na osnovu koncentraciono-zavisnih promena u genskoj ekspresiji u EA.hy926 ćelijama nakon 48 h izlaganja perfluorooktansulfonatu (1, 10 i 100 μM).

Gen	**BMC** (μM)	**BMCL** (μM)	**BMCU** (μM)
HOMEZ	0,90	0,027	1,08
NBPF26	1,99	1,38	3,46
CTHRC1	2,31	1,57	4,23
KHDC1	2,49	1,67	4,73
NOTUM	2,64	1,75	5,14

5.1.20. Modelovanje ekvivalentne doze za čoveka nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktansulfonatu

Dobijene vrednosti BMC-ova su u daljem koraku korišćene kao ulaz u PBTK model za izračunavanje HED-ova (µg/kg tm/dan) za svaki gen. Od svih vrednosti HED-ova za pojedinačne gene izračunata je vrednost P50, koja iznosi 21,69 µg/kg tm/dan. Na slici 5.1.20 su prikazane vrednosti HED-ova za analizirane gene u vidu rangiranog dijagrama tačaka sa linijama (engl. *lollipop plot*). Na slici je posebno istaknuto pet gena sa najnižim HED-ovima, koji predstavljaju najosetljivije transkriptomske odgovore EA.hy926 ćelija na izlaganje PFOS-u. Najniži HED pokazuje gen *HOMEZ* (3,91 µg/kg tm/dan), za kojim sledi *NBPF26*, sa nešto višim HED-om (8,68 µg/kg tm/dan). Tri gena, *CTHRC1*, *KHDC1* i *NOTUM*, pokazuju slične vrednosti HED-a u rasponu od 10,05–11,48 µg/kg tm/dan.



Slika 5.1.20. Dijagram tačaka sa linijama vrednosti ekvivalentne doze za čoveka za pojedinačne gene u EA.hy926 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu. Vrednosti BMC-ova određene na osnovu promena u globalnoj ekpresiji gena dobijenih sekvenciranjem iRNK (platforma DNBSEQ™) nakon izlaganja ćelija 1, 10 i 100 µM PFOS-u ili rastvaraču (0,05% DMSO;

0 μM PFOS) u trajanju od 48 h korišćene su kao ulaz u PBTK model za izračunavanje HED-ova (μg/kg tm/dan) za svaki gen. Svaka tačka označava vrednost HED-a za pojedinačni gen, a horizontalne linije omogućavaju lakše vizuelno poređenje među genima. Isprekidana linija označava P50 vrednost HED-a svih gena. Crvenom bojom istaknuto je pet gena sa najnižim vrednostima HED-a. U sivom panelu prikazane su tačne numeričke vrednosti HED-ova za ovih pet gena.

5.1.21. Procena rizika izloženosti perfluorooktansulfonatu za različite populacije zasnovana na promenama u ekspresiji gena u endotelnim ćelijama

U cilju procene potencijalnog rizika izloženosti PFOS-u na nivou promene ekspresije gena u endotelnim ćelijama korišćena je metrika BER koja podrazumeva integraciju dobijenih vrednosti HED-ova sa podacima o izloženosti različitih populacija. Ovakav pristup omogućava kvantitativno povezivanje transkriptomskih odgovora sa realnim scenarijima izloženosti. Rezultati prikazani u tabeli 5.1.6 ukazuju na izražene razlike u proceni rizika između opštih i profesionalno izloženih populacija. Vrednosti HED-ova za gene (P50 = 21,69 μg/kg tm/dan; P5 = 10,05 μg/kg tm/dan) korišćene su kao referentne tačke za izračunavanje vrednosti BER-ova u odnosu na procenjenu izloženost u svakoj populaciji.

U tabeli su prikazane vrednosti BER-ova izračunate na osnovu vrednosti P50 i P5 svih gena. BER_{P50} i BER_{P5} predstavljaju odnos između referentnih vrednosti HED-ova dobijenih iz transkriptomskih podataka i procenjene izloženosti populacije, pri čemu više vrednosti BER-ova ukazuju na veću marginu između biološki aktivnih doza i realne izloženosti, odnosno niži potencijalni rizik. Poređenje vrednosti BER-ova zasnovanih na P50 i P5 pokazuje konzistentan trend, pri čemu su vrednosti dobijene na osnovu P5 kontinuirano niže, što dodatno naglašava značaj najosetljivijih gena u proceni rizika. Ovaj pristup omogućava identifikaciju konzervativnijih scenarija izloženosti i potencijalno ranjivih populacija. Detaljnije, u opštim populacijama (G1–G11) dobijene su visoke vrednosti BER-ova, koje se u najvećem broju slučajeva kreću iznad 100, a u pojedinim populacijama dostižu i vrednosti iznad 1000. Najviše vrednosti BER-ova zabeležene su u populacijama sa najnižom procenjenom izloženošću (npr. G5), što ukazuje na veliku marginu između biološki aktivnih doza koje dovode do promena u ekspresiji gena i realne izloženosti. Ovi rezultati sugerišu nizak potencijalni rizik za aktivaciju analiziranih gena u endotelnim ćelijama u opštoj populaciji. Nasuprot tome, u profesionalno izloženim populacijama (O1–O5) vrednosti BER-ova su značajno niže, posebno u populacijama sa višim nivoima izloženosti (npr. O2), gde BER dostiže jednocifrenu vrednost (BER_{P50} = 3,8; BER_{P5} = 1,8).

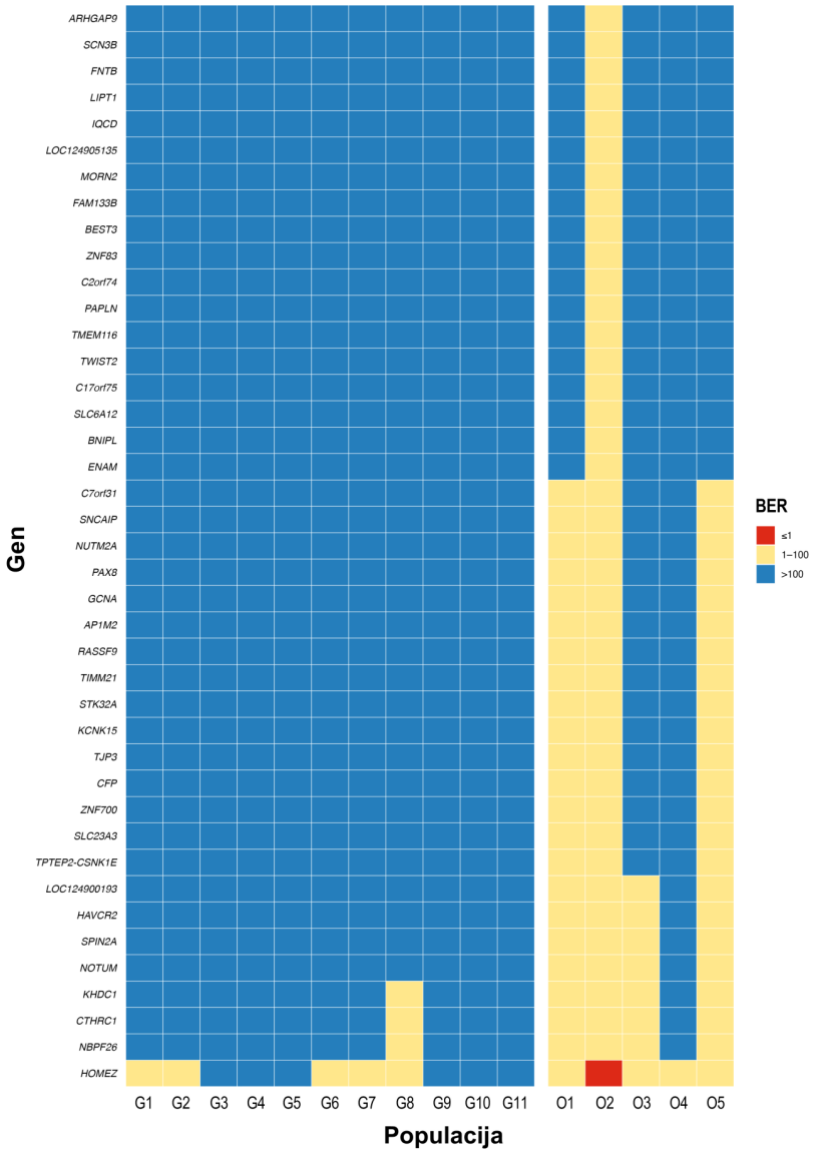
Ovo ukazuje na smanjenu marginu između doza koje dovode do promena u ekspresiji gena u endotelnim ćelijama i realnih nivoa izloženosti, odnosno na potencijalno povećan rizik.

Tabela 5.1.6. Vrednosti odnosa bioaktivne doze i izloženosti perfluorooktansulfonatu izračunate na osnovu P50 (21,69 μg/kg tm/dan) i P5 (10,05 μg/kg tm/dan) vrednosti ekvivalentne doze za čoveka za sve analizirane gene za opšte (G1–G11) i profesionalno izložene populacije (O1–O5). HED populacija predstavljaju procenjenu dnevnu izloženost (μg/kg tm/dan). Niže vrednosti BER-a ukazuju na smanjenu marginu izloženosti i potencijalno povećan rizik. Vrednosti BER-a <100 istaknute su podebljano.

HED gena (μg/kg tm/dan)	**Populacija**	**HED_{P50} populacija** (μg/kg tm/dan)	**BER_{P50}**	**BER_{P5}**
	G1	0,0484	448	208
	G2	0,0659	329	152
	G3	0,0166	1307	605
	G4	0,0250	868	402
	G5	0,0091	2384	1104
	G6	0,0453	479	222
	G7	0,0511	424	197
P50: 21,69	G8	0,1159	187	**87**
P5: 10,05	G9	0,0239	908	420
	G10	0,0237	916	424
	G11	0,0329	659	305
	O1	0,6025	**59**	**16,7**
	O2	5,7143	**3,8**	**1,8**
	O3	0,1360	160	**74**
	O4	0,0632	343	159
	O5	0,3054	**71**	**33**

Rezultati prikazani na slici 5.1.21 ilustruju raspodelu vrednosti BER-ova na nivou pojedinačnih gena i populacija. I za ovu analizu je korišćena BER metrika, ali su umesto vrednosti P50 i P5 kao referentne tačke korišćene pojedinačne vrednosti HED-a svakog gena. U opštim populacijama dominiraju visoke vrednosti BER-ova (plava boja), što potvrđuje postojanje značajne margine između doza koje menjaju ekspresiju pojedinačnih

gena i realne izloženosti. Suprotno tome, u profesionalno izloženim populacijama uočava se veća zastupljenost srednjih vrednosti BER-ova (žuta boja), posebno u populacijama O1, O2 i O5, što ukazuje na smanjenu marginu izloženosti i potencijalno povećan rizik. Posebno je značajno da se u populaciji O2 svi analizirani geni nalaze u opsegu BER-ova 1–100, što ukazuje na uniformno povećan nivo potencijalnog rizika. U populacijama O1 i O5 identifikovan je veći broj gena sa umerenim rizikom, dok su u populaciji O3 takve vrednosti prisutne kod manjeg broja gena. U populaciji O4 samo pojedinačni geni (npr. *HOMEZ*) pokazuju niže vrednosti BER-a. Dodatno, geni sa najnižim HED-om (npr. *HOMEZ*, *NBPF26*, *CTHRC1* i *KHDC1*) pokazuju niže vrednosti BER-a u većem broju populacija, što ukazuje na njihovu potencijalnu ulogu kao najosetljivijih molekularnih indikatora rizika.



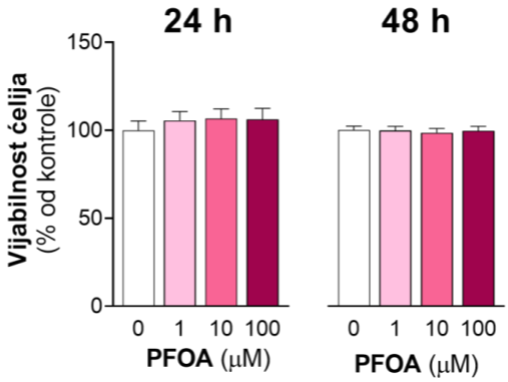
Slika 5.1.21. Toplotna mapa vrednosti odnosa bioaktivne doze i izloženosti perfluorooktansulfonatu za pojedinačne gene na nivou analiziranih populacija. Vrednosti BER-

ova su izračunate kao odnos između vrednosti HED-a po genu (μg/kg tm/dan) i procenjene izloženosti za svaku populaciju (μg/kg tm/dan), pri čemu su populacije podeljene na opšte (G1–G11) i profesionalno izložene (O1–O5). Vrednosti BER-ova prikazane su kategorizovano: crvena boja označava BER ≤ 1 (potencijalno visok rizik), žuta boja BER u opsegu 1–100 (umerena margina izloženosti), dok plava boja označava BER > 100 (niska verovatnoća rizika).

5.2. Efekti kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini

5.2.1. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na vijabilnost EA.hy926 ćelija

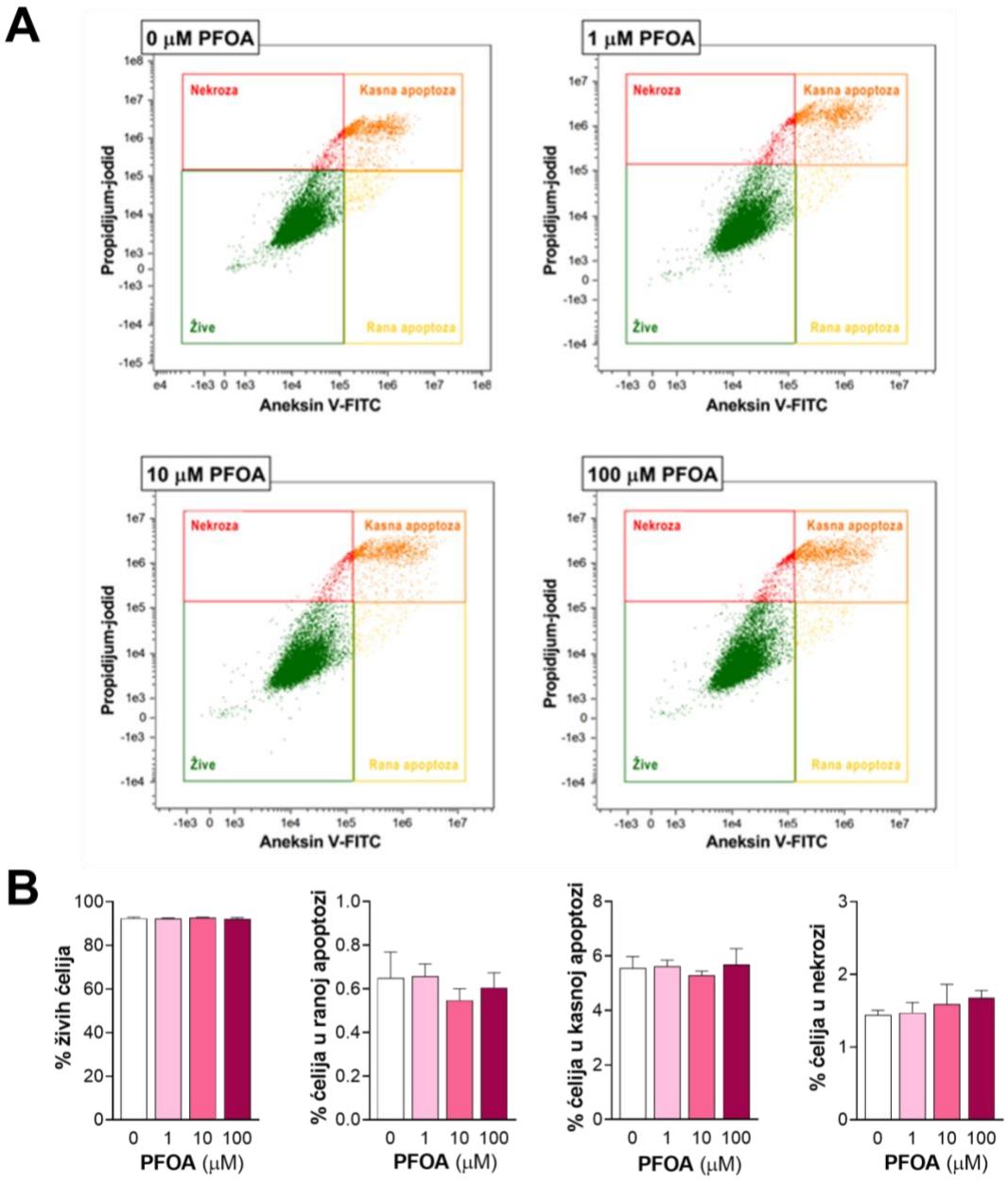
Vijabilnost EA.hy926 ćelija nakon kratkotrajnog izlaganja 1, 10 i 100 μM PFOA-i procenjena je pomoću testa sa bojom alamarBlue™. Rezultati su pokazali da izlaganje PFOA-i u trajanju od 24 h i 48 h nije uticalo na vijabilnost EA.hy926 ćelija ni pri jednoj od testiranih koncentracija (slika 5.2.1).



Slika 5.2.1. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na vijabilnost ćelija. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOA) u trajanju od 24 h i 48 h, nakon čega je određivana vijabilnost ćelija testom sa bojom alamarBlue™. Dobijene vrednosti su predstavljene kao procenat vijabilnosti u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOA (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

5.2.2. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na broj EA.hy926 ćelija u apoptozi i nekrozi

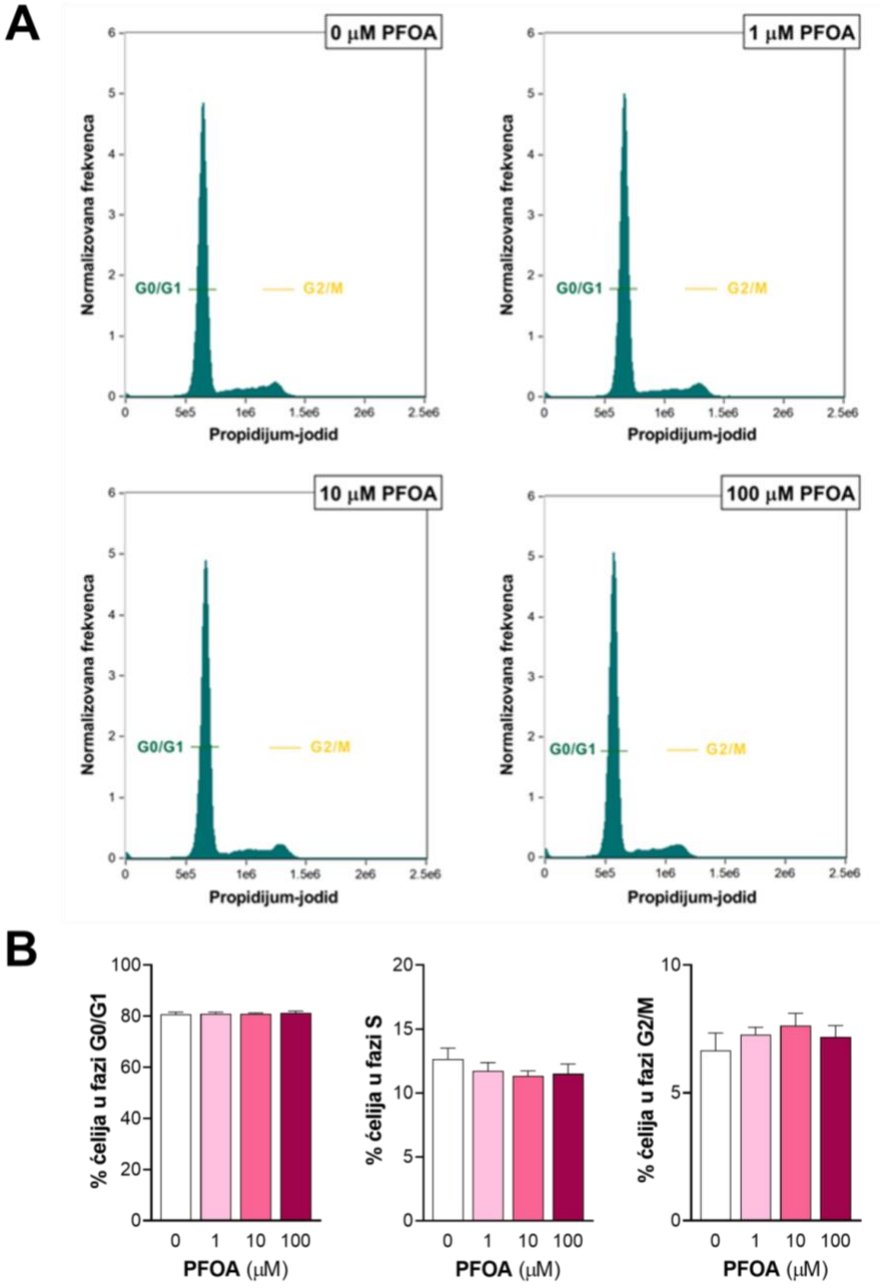
U cilju dodatnog utvrđivanja uticaja PFOA-e na preživljavanje endotelnih ćelija, ispitano je da li kratkotrajno izlaganje 1, 10 i 100 μM PFOA-i indukuje apoptozu i/ili nekrozu EA.hy926 ćelija. Rezultati su pokazali da izlaganje odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOA-e u trajanju od 48 h nije izazvalo ni apoptozu, ni nekrozu ćelija. Kao i kod izlaganja EA.hy926 ćelija PFOS-u, i ovde je najveći procenat živih ćelija (~92%), dok je procenat ćelija u apoptozi i nekrozi značajno manji (slika 5.2.2A i B).



Slika 5.2.2. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na broj ćelija u apoptozi i nekrozi. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOA) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivan udeo ćelija u apoptozi i nekrozi metodom protočne citometrije korišćenjem aneksina V-FITC i PI-a. **(A)** Reprezentativni dvostruko rasuti dijagrami prikazuju distribuciju ćelija u četiri jasno definisana kvadranta: donji levi – žive ćelije (aneksin V-FITC$^-$/PI$^-$); donji desni – ćelije u ranim fazama apoptoze (aneksin V-FITC$^+$/PI$^-$); gornji desni – ćelije u kasnim fazama apoptoze (aneksin V-FITC$^+$/PI$^+$); gornji levi – ćelije u nekrozi (aneksin V-FITC$^-$/PI$^+$). **(B)** Dobijene vrednosti su predstavljene kao procenat ćelija u određenom kvadrantu, odnosno kao procenat živih ćelija, ćelija u ranoj apoptozi, kasnoj apoptozi i nekrozi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

5.2.3. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na ćelijski ciklus u EA.hy926 ćelijama

U narednom koraku ispitan je uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOA-i na ćelijski ciklus primenom protočne citometrije nakon bojenja PI-om. Analiza je pokazala da nema statistički značajnih promena u raspodeli ćelija po fazama ciklusa (slika 5.2.3A i B). Kao i kod izlaganja PFOS-u, i ovde je najveći procenat ćelija u fazi G0/G1 (80,70–81,30%), dok je procenat ćelija u fazama S i G2/M značajno manji.

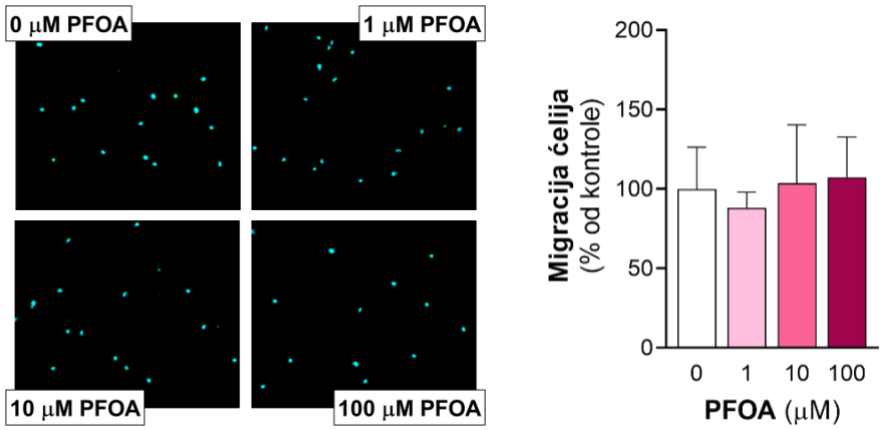


Slika 5.2.3. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na ćelijski ciklus. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOA)

u trajanju od 48 h, nakon čega su određivane faze ćelijskog ciklusa metodom protočne citometrije nakon bojenja PI-om. **(A)** Reprezentativni histogrami prikazuju dva jasno definisana regiona: levi – ćelije u fazi G0/G1; desni – ćelije u fazi G2/M. Ćelije u fazi S su identifikovane između dva regiona. **(B)** Dobijene vrednosti su predstavljene kao procenat ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa, odnosno kao procenat ćelija u fazama G0/G1, S i G2/M. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

5.2.4. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na migraciju EA.hy926 ćelija

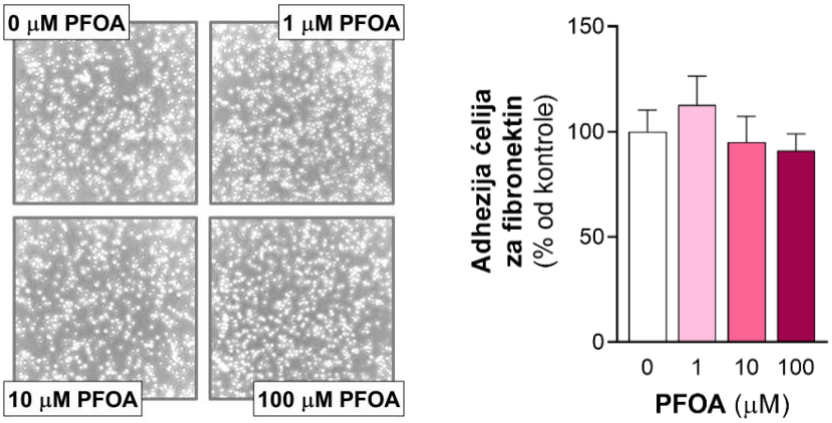
Primenom Transwell® sistema sa membranom prečnika pora 8 μm ispitano je da li izlaganje EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOA-i u trajanju od 48 h utiče na migraciju endotelnih ćelija u uslovima *in vitro*. Analiza je pokazala da, u poređenju sa kontrolom, nisu uočene statistički značajne promene u migraciji ćelija ni pri jednoj od ispitivanih koncentracija PFOA-e (slika 5.2.4).



Slika 5.2.4. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na migraciju ćelija. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOA) u trajanju od 48 h, nakon čega je ispitivana migracija endotelnih ćelija pomoću modifikovane Boyden Chamber tehnike u Transwell® sistemu (prečnik pora 8 μm). Prikazane su reprezentativne fotografije sa fluorescentnog mikroskopa. Srednja vrednost broja ćelija koje su migrirale kroz poroznu polikarbonatnu membranu Transwell® sistema dobijena je iz 10–15 nasumično odabranih mikroskopskih polja po grupi, a dobijene vrednosti su zatim predstavljene kao procenat ćelija koje su migrirale u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOA (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

5.2.5. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na adheziju EA.hy926 ćelija za ekstracelularni matriks

U narednom koraku ispitan je uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOA-i na adheziju ćelija za ECM. Rezultati su pokazali da nakon 48 h izlaganja odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOA-e ne dolazi do značajnijih promena u adheziji ćelija za fibronektin u odnosu na kontrolu (slika 5.2.5).

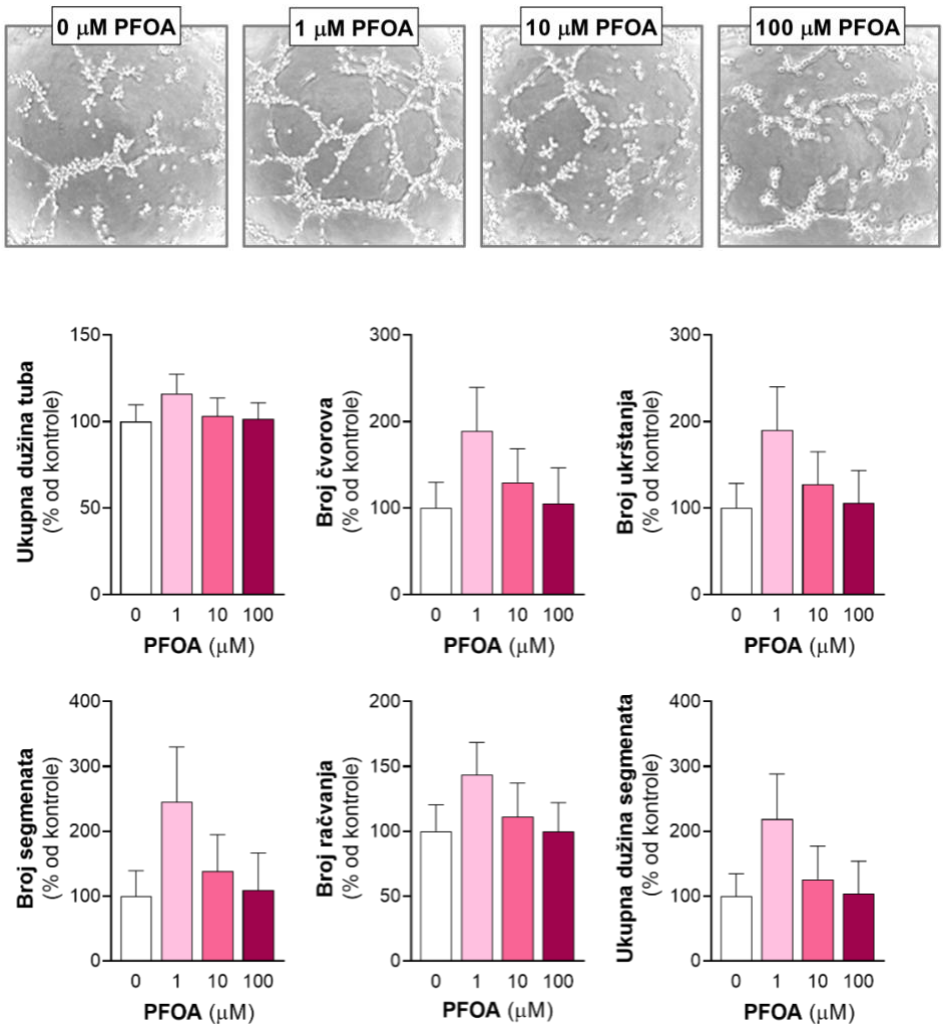


Slika 5.2.5. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na adheziju ćelija za ekstracelularni matriks. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOA) u trajanju od 48 h, nakon čega je ispitivana adhezija ćelija za fibronektin. Prikazane su reprezentativne fotografije sa svetlosnog mikroskopa. Broj vezanih ćelija za ECM određivan je testom sa bojom SRB. Dobijene vrednosti su predstavljene kao procenat vezanih ćelija za fibronektin u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOA (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

5.2.6. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na angiogenezu EA.hy926 ćelija

Potom je ispitan uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOA-i na formiranje endotelnih tuba u uslovima *in vitro*. Morfometrijska analiza dobijenih rezultata je, kao i u slučaju podataka dobijenih nakon izlaganja ćelija PFOS-u, urađena korišćenjem alata Angiogenesis Analyzer u sklopu programa NIH Image J. Od dvadeset dostupnih parametara, za potrebe statističke analize izabrano je šest najrelevantnijih parametara angiogeneze: ukupna dužina tuba, broj čvorova, broj ukrštanja, broj segmenata, ukupna dužina segmenata i ukupna dužina račvanja. Dobijeni rezultati su ukazali da

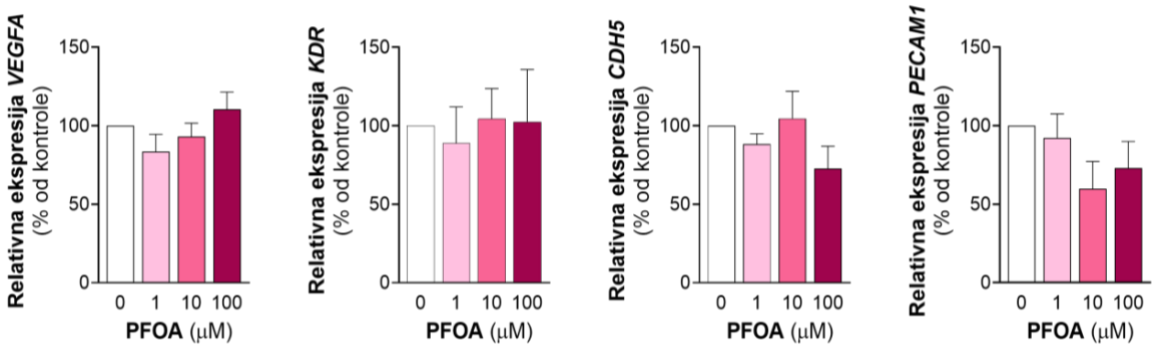
odabrane koncentracije PFOA-e ne utiču značajno na promene u analiziranim parametrima angiogeneze nakon 48 h izlaganja (slika 5.2.6).



Slika 5.2.6. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na angiogenezu u uslovima *in vitro*. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOA) u trajanju od 48 h, nakon čega je ispitivano formiranje endotelnih tubula u uslovima *in vitro* korišćenjem trodimenzionalnog matriksa Cultrex BME u trajanju od 8 h. Prikazane su reprezentativne fotografije sa svetlosnog mikroskopa. Morfometrijska analiza je urađena korišćenjem alata Angiogenesis Analyzer u sklopu programa NIH Image J. Dobijene vrednosti su predstavljene kao procenat odgovorajućeg parametra angiogeneze u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOA (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

5.2.7. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na relativnu ekspresiju gena za odabrane proteine uključene u regulaciju angiogeneze u EA.hy926 ćelijama

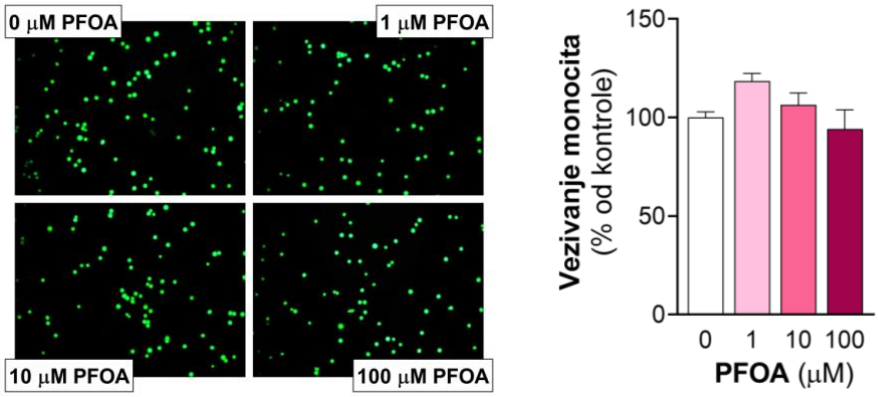
Relativna ekspresija gena uključenih u regulaciju angiogeneze – *VEGFA*, *KDR*, *CDH5* i *PECAM1* – određena je metodom RT-qPCR nakon 48 h izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOA-i. Rezultati su pokazali da izlaganje ćelija odabranim koncentracijama PFOA-e ne utiče značajno na nivo iRNK ni za jedan od ispitivanih gena (slika 5.2.7).



Slika 5.2.7. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na relativnu ekspresiju gena za proteine uključene u regulaciju angiogeneze. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOA) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivan nivo iRNK za *VEGFA*, *KDR*, *CDH5* i *PECAM1* metodom RT-qPCR. Dobijene vrednosti su predstavljene kao relativna ekspresija odgovarajućeg gena u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOA (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja. *$p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

5.2.8. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na vezivanje monocita za monosloj EA.hy926 ćelija

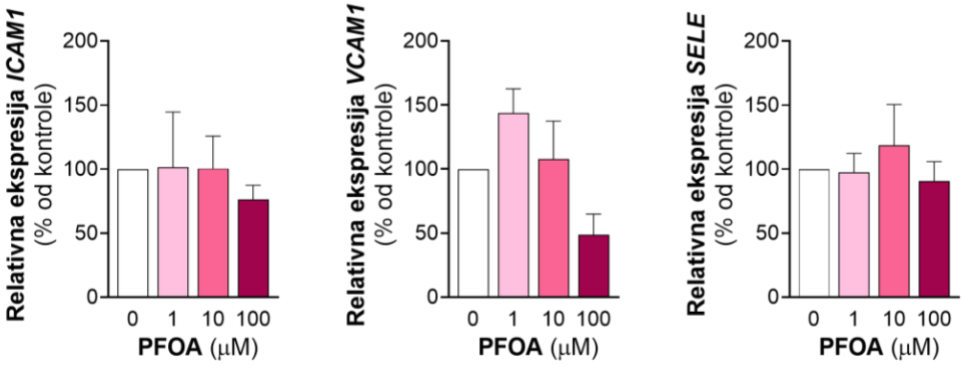
Uticaj PFOA-e na vezivanje monocita za monosloj endotelnih ćelija procenjen je korišćenjem fluorescentno obeležene linije humanih monocita U937. EA.hy926 ćelije su izlagane odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOA-e (1, 10 i 100 μM) u trajanju od 48 h, nakon čega je kvantifikovano vezivanje U937 ćelija. Analiza je pokazala da, u poređenju sa kontrolom, nijedna od ispitivanih koncentracija nije dovela do statistički značajnih promena u vezivanju monocita za monosloj endotelnih ćelija (slika 5.2.8).



Slika 5.2.8. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na vezivanje monocita za monosloj endotelnih ćelija. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOA) u trajanju od 48 h, nakon čega je ispitivano vezivanje fluorescentno obeleženih U937 monocita za monosloj endotelnih ćelija. Prikazane su reprezentativne fotografije sa fluorescentnog mikroskopa. Srednja vrednost broja vezanih U937 monocita dobijena je iz 10–15 nasumično odabranih mikroskopskih polja po grupi, a dobijene vrednosti su zatim predstavljene kao procenat vezanih monocita za monosloj endotelnih ćelija u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOA (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

5.2.9. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule u EA.hy926 ćelijama

Relativna ekspresija gena za ICAM-1 (*ICAM1*), VCAM-1 (*VCAM1*) i E-selektin (*SELE*), CAM-ova koji učestvuju u vezivanju monocita za monosloj endotelnih ćelija, praćena je metodom RT-qPCR nakon izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOA-i u trajanju od 48 h.



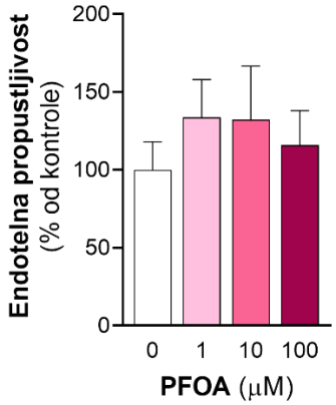
Slika 5.2.9. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na relativnu ekspresiju gena za ćelijske adhezivne molekule. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOA) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivan nivo

iRNK za *ICAM1*, *VCAM1* i *SELE* metodom RT-qPCR. Dobijene vrednosti su predstavljene kao relativna ekspresija odgovarajućeg gena u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOA (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

U poređenju sa kontrolom, nije uočeno statistički značajno odstupanje u ekspresiji *ICAM1*, *VCAM1* i *SELE* ni pri jednoj od ispitivanih koncentracija (slika 5.2.9).

5.2.10. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na propustljivost monosloja EA.hy926 ćelija

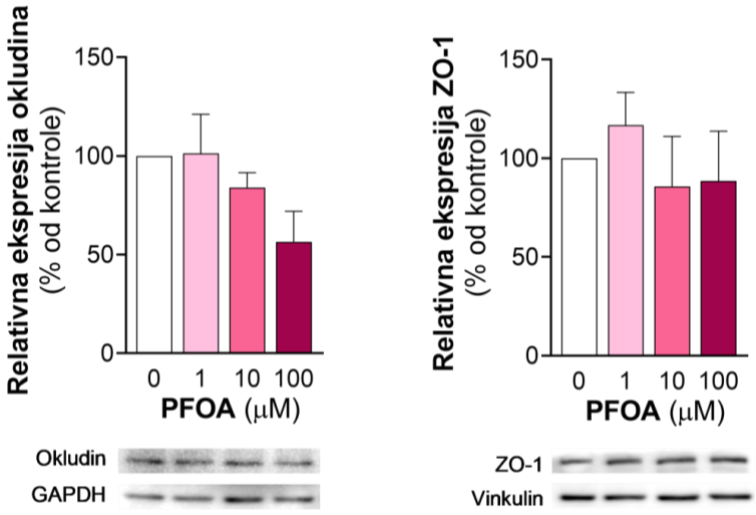
U narednom koraku ispitan je uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOA-e (1, 10 i 100 μM) na endotelnu propustljivost, s obzirom na ključnu ulogu endotela u formiranju polupropustljive barijere. Za merenje propustljivosti korišćen je dvokomponentni Transwell® sistem i FD40. Analiza je pokazala da, u poređenju sa kontrolom, nijedna od ispitivanih koncentracija nije dovela do statistički značajnih promena u propustljivosti monosloja EA.hy926 ćelija (slika 5.2.10).



Slika 5.2.10. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na propustljivost endotela. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOA) u trajanju od 48 h, nakon čega je ispitivana propustljivost monosloja endotelnih ćelija korišćenjem FD40 u Transwell® sistemu (prečnik pora 0,4 μm). Endotelna propustljivost je izračunata kao prosečna promena fluorescentnog signala u donjem odeljku Transwell® ploče za 5 min tokom ukupno 120 min, a dobijene vrednosti su predstavljene kao procenat propustljivosti monosloja endotelnih ćelija u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOA (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

5.2.11. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na ekspresiju okludina i ZO-1 u EA.hy926 ćelijama

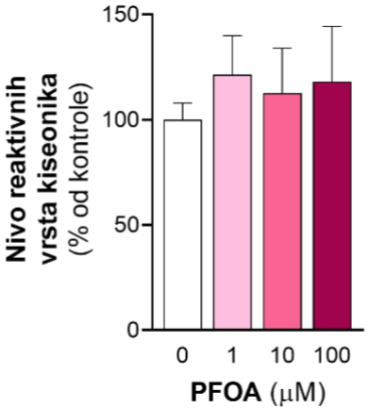
Potom je ispitivan uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOA-e (1, 10 i 100 μM) na ekspresiju okludina i ZO-1, dva proteina koji ulaze u sastav TJ. U skladu sa prethodno opisanim rezultatima, Western blot analiza je pokazala da ispitivane koncentracije PFOA-e ne utiču značajno na promenu u nivou ekspresije ni jednog od ova dva proteina u odnosu na kontrolu (slika 5.2.11).



Slika 5.2.11. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na ekspresiju okludina i ZO-1. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOA) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivana ekspresija okludina i ZO-1 metodom Western blot. Prikazane su reprezentativne Western blot slike. Kvantifikacija rezultata je urađena u programu NIH Image J. Dobijene vrednosti za svaki uzorak su normalizovane na ekspresiju GAPDH-a (za okludin) ili vinkulina (za ZO-1) u datom uzorku, a rezultati su predstavljeni relativno u odnosu na normalizovanu ekspresiju ispitivanog proteina u kontroli – 0 μM PFOA (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

5.2.12. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na nivo reaktivnih vrsta kiseonika u EA.hy926 ćelijama

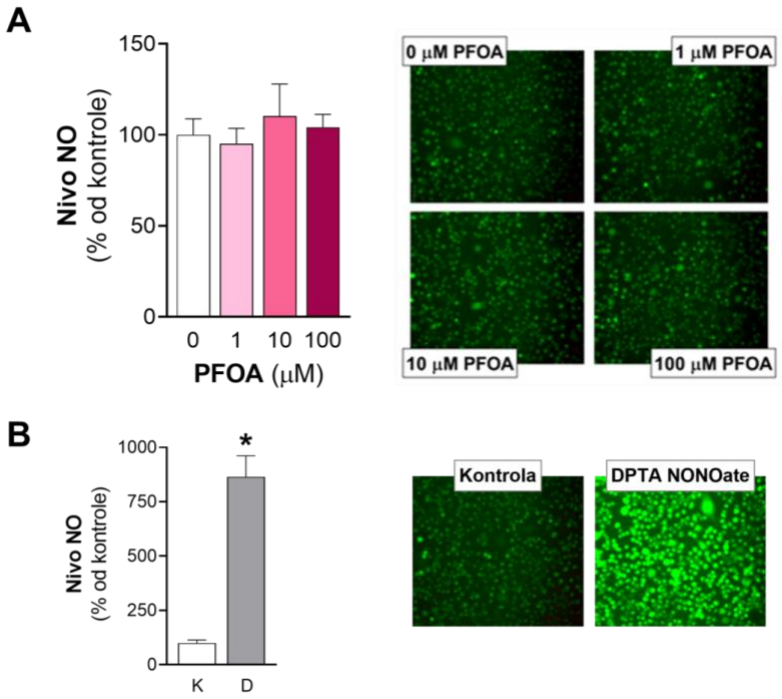
Ispitano je da li izlaganje odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOA-e (1, 10 i 100 μM) u trajanju od 48 h menja nivo ROS-a u EA.hy926 ćelijama. Za detekciju je korišćena fluorescentna proba H_2DCFDA. Analiza je pokazala da, u poređenju sa kontrolom, nije uočena statistički značajna promena u stvaranju ROS-a ni pri jednoj od ispitivanih koncentracija PFOA-e (slika 5.2.12).



Slika 5.2.12. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na nivo reaktivnih vrsta kiseonika. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOA) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivan nivo ROS-a korišćenjem reagensa H_2DCFDA. Dobijene vrednosti su predstavljene kao procenat nivoa ROS-a u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOA (100%). Normalizacija dobijenih rezultata na broj ćelija urađena je pomoću testa sa bojom SRB. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja.

5.2.13. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na nivo azot-monoksida u EA.hy926 ćelijama

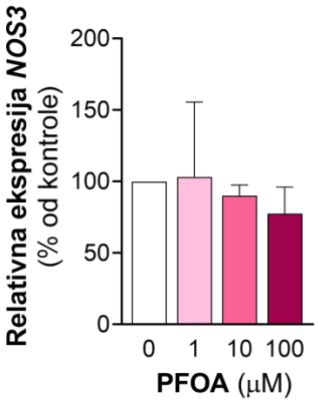
U narednom koraku ispitan je uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOA-i na nivo NO-a upotrebom reagensa DAF-FM DA. Dobijeni rezultati su pokazali da ni jedna od ispitivanih koncentracija PFOA-e ne utiče značajno na promenu nivoa NO-a u endotelnim ćelijama nakon 48 h izlaganja (slika 5.2.13A). S druge strane, donor NO-a DPTA NONOat je očekivano povećao nivo NO-a za gotovo 800% u odnosu na nestimulisanu kontrolu i izazvao snažan fluorescentni signal u EA.hy926 ćelijama (slika 5.2.13B).



Slika 5.2.13. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na nivo azot-monoksida. **(A)** Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOA) u trajanju od 48 h, nakon čega je praćeno stvaranje NO-a pomoću fluorescentnog čitača mikroploča (grafički prikaz) i fluorescentnog mikroskopa (reprezentativne fotografije) korišćenjem reagensa DAF-FM DA. **(B)** Efekat DPTA NONOata (pozitivna kontrola) na stvaranje NO-a. Ćelije su prethodno inkubirane sa 2,5 μM DAF-FM DA tokom 15 min, nakon čega je dodat 100 μM DPTA NONOat u trajanju od 30 min. Stvaranje NO-a je praćeno pomoću fluorescentnog čitača mikroploča (grafički prikaz) i fluorescentnog mikroskopa (reprezentativne fotografije). K – kontrola; D – DPTA NONOat. **(A, B)** Dobijene vrednosti sa fluorescentnog čitača mikroploča su predstavljene kao procenat nivoa NO-a u odnosu na kontrolu (100%). Normalizacija dobijenih rezultata na broj ćelija urađena je pomoću testa sa bojom SRB. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4 ponavljanja. *$p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

5.2.14. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na relativnu ekspresiju gena za endotelnu azot-monoksid sintazu u EA.hy926 ćelijama

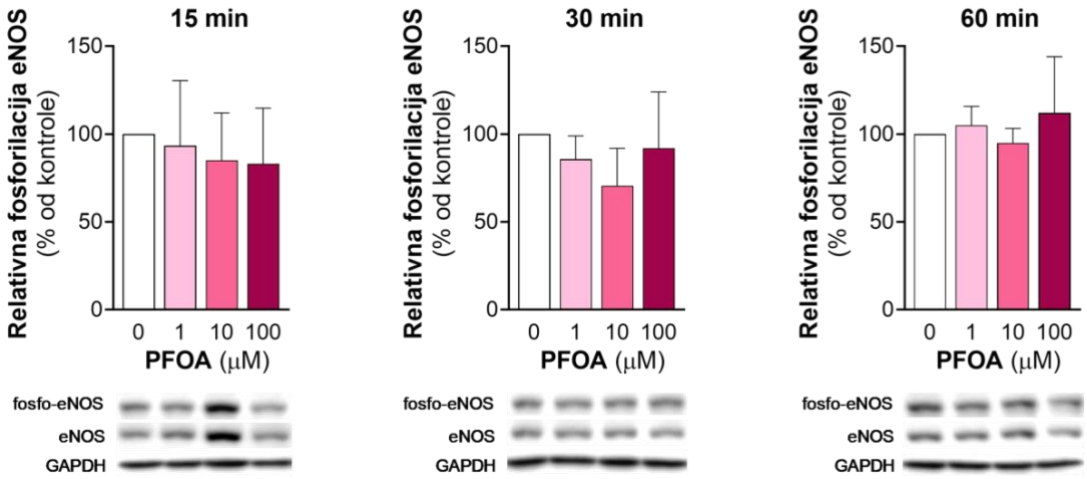
Metodom RT-qPCR ispitan je uticaj kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOA-i na relativnu ekspresiju gena za eNOS (*NOS3*). Dobijeni rezultati pokazali su da odabrane koncentracije PFOA-e ne utiču značajno na promenu nivoa iRNK za NOS u odnosu na kontrolu (slika 5.2.14).



Slika 5.2.14. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na relativnu ekspresiju gena za endotelnu azot-monoksid sintazu. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOA) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivan nivo iRNK za *NOS3* metodom RT-qPCR. Dobijene vrednosti su predstavljene kao relativna ekspresija *NOS3* u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOA (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 3 ponavljanja.

5.2.15. Efekat kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini na fosforilaciju endotelne azot-monoksid sintaze u EA.hy926 ćelijama

Metodom Western blot ispitano je da li kratkotrajno izlaganje PFOA-i (1, 10 i 100 μM) utiče na fosforilaciju eNOS-a nakon 15, 30 i 60 min. U poređenju sa kontrolom, nije uočena statistički značajna promena u fosforilaciji eNOS-a ni u jednoj vremenskoj tački izlaganja navedenim koncentracijama PFOA-e (slika 5.2.15).

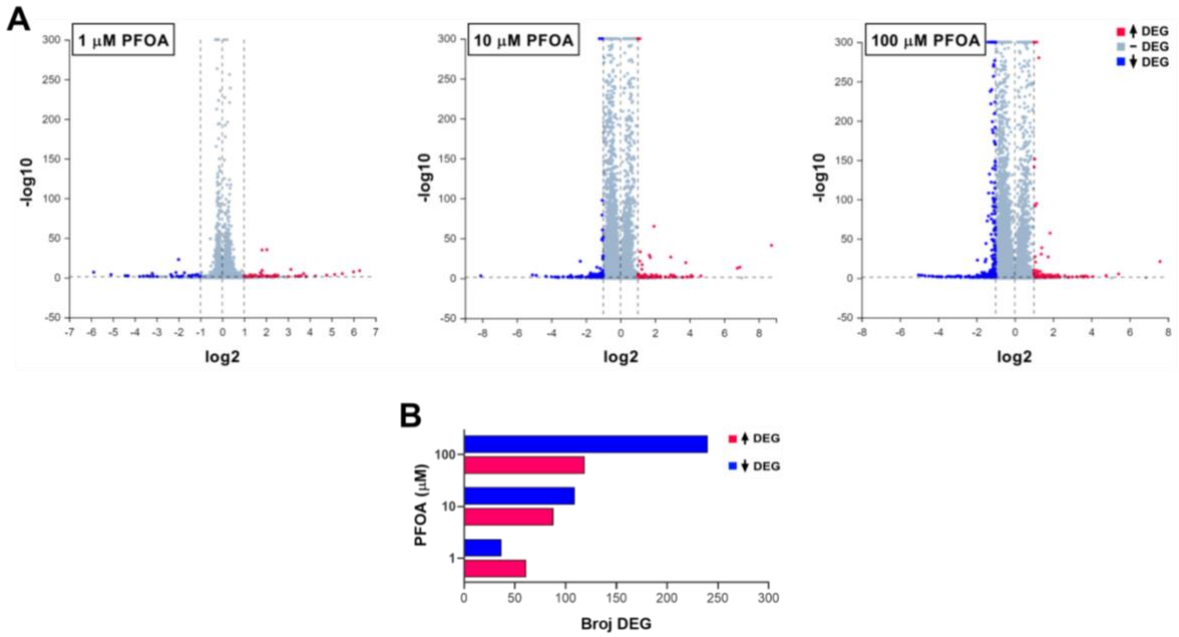


Slika 5.2.15. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na fosforilaciju endotelne azot-monoksid sintaze. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili

rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOA) u trajanju od 15, 30 i 60 min, nakon čega je određivana fosforilacija eNOS-a metodom Western blot. Prikazane su reprezentativne Western blot slike. Kvantifikacija rezultata je urađena u programu NIH Image J. Dobijene vrednosti za svaki uzorak su normalizovane na ekspresiju eNOS-a u datom uzorku, a rezultati su predstavljeni relativno u odnosu na normalizovanu ekspresiju fosfo-eNOS-a u kontroli – 0 μM PFOA (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 3-4 ponavljanja.

5.2.16. Identifikacija diferencijalno eksprimiranih gena u EA.hy926 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini

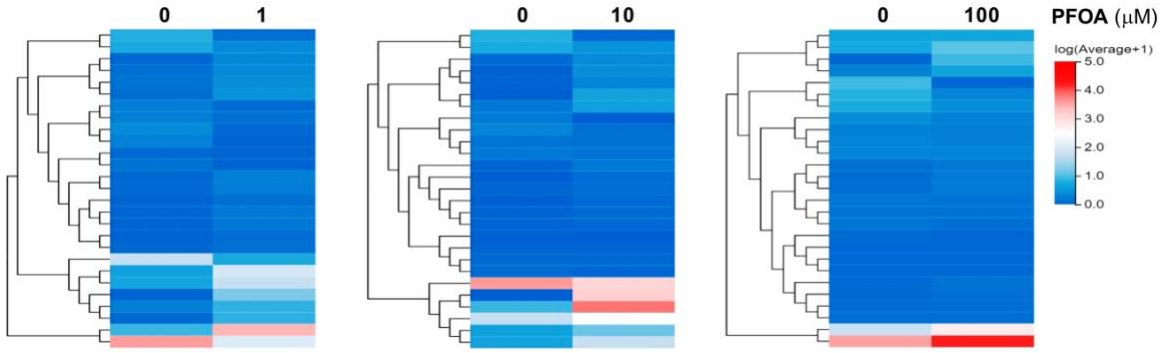
Analizom transkriptoma identifikovani su DEG-ovi u EA.hy926 ćelijama nakon 48 h izlaganja odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOA-e (1, 10 i 100 μM), i to kao geni sa najmanje dvostrukom promenom ekspresije u odnosu na kontrolu ($|log2FC| > 1$) i Q-vrednošću $\leq 0,05$ (slika 5.2.16A). Broj DEG-ova je varirao u zavisnosti od koncentracije PFOA-e, pa je tako najveći broj DEG-ova zabeležen pri najvišoj koncentraciji od 100 μM PFOA-i: ukupno 359 DEG-ova (119 gena sa povećanom, 240 gena sa smanjenom ekspresijom). Nasuprot tome, izlaganje EA.hy926 ćelija 10 i 1 μM PFOA-i u trajanju od 48 h dovelo je do 197 DEG-ova (88 gena sa povećanom, 109 gena sa smanjenom ekspresijom) i 98 DEG-ova (61 gen sa povećanom, 37 gena sa smanjenom ekspresijom), redom (slika 5.2.16B).



Slika 5.2.16. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na globalnu ekspresiju gena. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO;

0 μM PFOA) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivana globalna ekspresija gena sekvenciranjem iRNK primenom platforme DNBSEQ™. **(A)** Vulkanski dijagram globalne ekspresije iRNK i broj DEG-ova. X-osa prikazuje promenu ekspresije u odnosu na kontrolu – 0 μM PFOA nakon transformacije u log2, dok y-osa prikazuje vrednost značajnosti (Q-vrednost) nakon transformacije u –log10. Statistički značajno povećano eksprimirani geni nakon 48 h izlaganja odabranoj koncentraciji PFOA-e označeni su crvenim tačkama, smanjeno eksprimirani geni su prikazani plavim tačkama, dok su geni bez statistički značajne promene ekspresije predstavljeni sivim tačkama. **(B)** X-osa prikazuje broj DEG-ova nakon 48 h izlaganja, a y-osa različite koncentracije PFOA-e. Za svaku koncentraciju, crveni stubići predstavljaju broj gena sa povećanom ekspresijom, dok plavi stubići predstavljaju broj gena sa smanjenom ekspresijom.

Na slici 5.2.17 prikazani su rezultati hijerarhijskog grupisanja transkripata pomoću toplotnih mapa, koje omogućavaju vizuelni prikaz obrazaca ekspresije gena u kontrolnim i tretiranim uzorcima EA.hy926 ćelija izlaganih različitim mikromolarnim koncentracijama PFOA-e. Prikazani podaci predstavljaju apsolutne nivoe ekspresije gena, dok hijerarhijsko grupisanje odražava sličnost ekspresionih profila između pojedinačnih gena.



Slika 5.2.17. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na hijerarhijsko grupisanje transkripata. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOA) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivana globalna ekspresija gena sekvenciranjem iRNK primenom platforme DNBSEQ™. Toplotne mape prikazuju apsolutne nivoe ekspresije gena (log[Average+1]) za kontrolne i tretirane uzorke po pojedinačnim koncentracijama PFOA. Analiza klastera (hijerarhijsko grupisanje) zasniva se na sličnosti profila ekspresije gena i omogućava identifikaciju grupa transkripata sa sličnim obrascima ekspresije. Intenzitet boje odražava nivo ekspresije: nijanse plave označavaju niže, a nijanse crvene više nivoe ekspresije, dok svetlije nijanse ukazuju na srednje vrednosti.

Detaljnije, pri koncentraciji od 1 μM PFOA-e dominantne su nijanse plave boje, što ukazuje da većina analiziranih gena ima nizak do umeren nivo ekspresije, bez izraženih

globalnih razlika u odnosu na kontrolne uzorke. Hijerarhijsko grupisanje identifikuje manje klastere gena sa sličnim obrascima ekspresije, ali bez jasne separacije između kontrolnih i tretiranih uzoraka. Pri koncentraciji od 10 μM PFOA-e i dalje dominiraju niži nivoi ekspresije, uz pojavu ograničenog broja gena sa višim vrednostima (svetlije ili crvenije nijanse). Ove promene su lokalizovane i odnose se na pojedinačne klastere gena, dok globalni ekspresioni profil ostaje relativno sličan kontrolnim uzorcima. Pri koncentraciji od 100 μM PFOA-e uočava se nešto veći broj gena sa višim nivoima ekspresije u pojedinačnim klasterima, ali i dalje bez izraženog globalnog pomaka u ukupnom transkriptomskom profilu. Hijerarhijsko grupisanje ukazuje na postojanje lokalizovanih promena u ekspresionim obrascima, dok većina gena zadržava nizak do umeren nivo ekspresije.

Polazeći od skupa DEG-ova u svakoj od tri grupe ćelija, Venov dijagram (slika 5.2.18) prikazuje njihove preseke nakon 48-časovnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOA-i. Zajedničkih DEG-ova za sve tri koncentracije bilo je 10. Broj zajedničkih promenjenih gena između grupa ćelija izlaganih 1 i 10 μM PFOA-i je 17, između 10 i 100 μM PFOA-e je 61, dok broj zajedničkih promenjenih gena između 1 i 100 μM PFOA-e iznosi 11.



Slika 5.2.18. Efekat kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini na broj jedinstvenih i zajedničkih diferencijalno eksprimiranih gena. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOA) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivana globalna ekspresija gena sekvenciranjem iRNK primenom platforme DNBSEQ™. Venov dijagram prikazuje DEG-ove za svaku pojedinačnu koncentraciju PFOA-e u poređenju sa kontrolom – 0 μM PFOA, pri čemu se ističe broj jedinstvenih i preklapajućih DEG-ova među navedenim koncentracijama PFOA-e.

U tabeli 5.2.1 su prikazani DEG-ovi sa najizraženijim povećanjem relativne ekspresije (najviše vrednosti log2 promene FC) nakon 48-časovnog izlaganja EA.hy926 ćelija odabranim koncentracijama PFOA-e, u poređenju sa kontrolom.

Tabela 5.2.1. Pet diferencijalno eksprimiranih gena sa najvećim povećanjem relativne ekspresije u EA.hy926 ćelijama nakon 48 h izlaganja perfluorooktanskoj kiselini (1, 10 i 100 μM), u poređenju sa kontrolom.

1 μM PFOA			
Gen	**log2FC**	**FC**	**FDR**
ATP5MF–PTCD1	6,00	64,11	$4{,}37 \times 10^{-08}$
BIVM–ERCC5	5,14	35,18	$8{,}39 \times 10^{-05}$
EFNA4–EFNA3	4,77	27,35	$7{,}10 \times 10^{-04}$
HSFX2	4,26	19,13	$7{,}00 \times 10^{-03}$
AQP7B	3,83	14,20	$2{,}82 \times 10^{-02}$

10 μM PFOA			
Gen	**log2FC**	**FC**	**FDR**
EFNA4–EFNA3	6,91	120,49	$1{,}14 \times 10^{-14}$
ATP5MF–PTCD1	6,76	108,49	$2{,}07 \times 10^{-13}$
GCOM1	4,65	25,08	$8{,}11 \times 10^{-04}$
EFCAB12	4,18	18,07	$6{,}49 \times 10^{-03}$
TBX20	4,09	17,07	$1{,}31 \times 10^{-04}$

100 μM PFOA			
Gen	**log2FC**	**FC**	**FDR**
EFNA4–EFNA3	7,59	192,24	$6{,}27\times 10^{-22}$
ZNF559–ZNF177	5,42	42,90	$3{,}94 \times 10^{-06}$
TP53TG3B	4,77	27,30	$3{,}52 \times 10^{-04}$
TCP10L	4,08	16,90	$8{,}06 \times 10^{-03}$
RHBDL2	3,80	13,97	$1{,}99 \times 10^{-02}$

Pri izlaganju ćelija 1 μM PFOA-i, najizraženije povećanje ekspresije zabeleženo je za fuzioni transkript *ATP5MF* (engl. *ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit F2*)*–PTCD1* (engl. *pentatricopeptide repeat domain 1*) (~64 puta u odnosu na kontrolu). Značajno su povećane i ekspresije *BIVM–ERCC5* (FC = 35,18) i *EFNA4–EFNA3* (FC = 27,35), dok su *HSFX2* (engl. *heat shock transcription factor 2*) i *AQP7B* (engl. *aquaporin 7B*) pokazali nešto niži, ali i dalje statistički značajan porast ekspresije: ~19 i 14 puta u odnosu na kontrolu, redom. Nakon izlaganja ćelija 10 μM PFOA-i, uočava se dodatno pojačavanje ekspresije pojedinih gena. Najveći porast beleži *EFNA4–EFNA3* (FC = 120,49), praćen genom *ATP5MF–PTCD1* (FC = 108,49). Ovi podaci ukazuju na izražen koncentraciono-zavisan efekat PFOA-e. Geni *GCOM1* (fuzioni transkript između *MYZAP* [engl. *myocardial zonula adherens protein*] i *POLR2M* [engl. *polymerase (RNA) II (DNA*

directed) polypeptide M]), *EFCAB12* (engl. *EF-hand calcium-binding domain-containing protein 12*) i *TBX20* (engl. *T-box transcription factor 20*) takođe pokazuju značajan porast, sa povećanjem ekspresije između 17 i 25 puta u odnosu na kontrolu, uz niske vrednosti FDR-a. Pri najvišoj koncentraciji, 100 μM PFOA, zabeležena je još izraženija aktivacija pojedinih gena, posebno *EFNA4–EFNA3*, koji dostiže najveće vrednosti među svim identifikovanim DEG-ovima (log2 = 7,59; FC = 192,24; FDR = $6,27 \times 10^{-22}$). Značajno povećanje ekspresije uočeno je i za *ZNF559* (engl. *zinc finger protein 559*)*–ZNF177* (engl. *zinc finger protein 177*), *TP53TG3B* (engl. *TP53 target 3B*), *TCP10L* (engl. *T-complex 10 like*) i *RHBDL2* (engl. *rhomboid like 2*), sa vrednostima FC u rasponu od približno 14 do 43. Zapaža se da se pojedini geni (posebno *EFNA4–EFNA3* i *ATP5MF–PTCD1*) dosledno javljaju kao najosetljiviji markeri izloženosti PFOA-i pri svim ispitivanim koncentracijama. Ukupno posmatrano, podaci potvrđuju da PFOA indukuje robustan i koncentraciono-zavisan porast ekspresije specifičnih gena u EA.hy926 ćelijama, sa progresivnim povećanjem intenziteta odgovora pri višim koncentracijama.

U tabeli 5.2.2 su prikazani DEG-ovi sa najizraženijim smanjenjem relativne ekspresije (najniže vrednosti log2 promene FC) u EA.hy926 ćelijama nakon 48-časovnog izlaganja odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOA-e, u poređenju sa kontrolom. Pri izlaganju ćelija 1 μM PFOA-i, najizraženija inhibicija uočena je za gen *GALNT4* (engl. *polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 4*) sa FC = 0,017, što ukazuje na gotovo šezdesetostruko smanjenje ekspresije u odnosu na kontrolu. Značajno su inhibisani i *TP53TG3C* (engl. *TP53 target 3C*), *CT47A1* (engl. *cancer/testis antigen family 47 member A1*), *TRIM73* (engl. *tripartite motif containing 73*) i *MMP24-AS1* (engl. *matrix metallopeptidase 24 antisense RNA 1)–EDEM2* (engl. *ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 2*), sa vrednostima FC u rasponu od 0,029 do 0,051, što predstavlja raspon smanjenja ekspresije u odnosu na kontrolu od ~40 do 20 puta. Nakon izlaganja ćelija 10 μM PFOA-i, inhibitorni efekat je još izraženiji. Najveće smanjenje zabeleženo je za *GOLGA8K* (engl. *golgin A8 family member K*) sa FC = 0,004, što predstavlja izuzetno snažno smanjenje ekspresije, za preko 270 puta u odnosu na kontrolu. Geni *TP53TG3C* i *CCDC169–SOHLH2* takođe pokazuju značajno smanjenje, dok su *SMIM10L2A* (engl. *small integral membrane protein 10 like 2A*) i *APOBEC2* (engl. *apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 2*) inhibisani približno dvadesetostruko u odnosu na kontrolu. Pri najvišoj koncentraciji, 100 μM PFOA, najizraženije smanjenje ekspresije uočeno je za *TP53TG3* (za ~32 puta u odnosu na kontrolu). Značajno su smanjeni i *CCDC169–SOHLH2*,

TNFAIP8L2 (engl. *TNF alpha induced protein 8 like 2*)–*SCNM1* (engl. *sodium channel modifier 1*), *PCDHGA12* (engl. *protocadherin gamma subfamily A, 12*) i *MMP24-AS1–EDEM2*, sa vrednostima FC između 0,034 i 0,050 (raspon smanjenja ekspresije u odnosu na kontrolu od ~30 do 20 puta). Pojedini geni (npr. *CCDC169–SOHLH2* i *MMP24-AS1–EDEM2*) se pojavljuju među DEG-ovima sa najizraženijim smanjenjem relativne ekspresije i pri nižim koncentracijama, što ukazuje na njihovu doslednu osetljivost na PFOA-u. Ukupno posmatrano, rezultati pokazuju jasan i koncentraciono-zavisan inhibitorni efekat PFOA-e na gensku ekspresiju u EA.hy926 ćelijama, sa izrazito snažnim smanjenjem ekspresije pojedinih gena već pri izlaganju 1 µM PFOA-i, a sa dodatnim pojačanjem efekta pri višim koncentracijama.

Tabela 5.2.2. Pet diferencijalno eksprimiranih gena sa najvećim smanjenjem relativne ekspresije u EA.hy926 ćelijama nakon 48 h izlaganja perfluorooktanskoj kiselini (1, 10 i 100 µM), u poređenju sa kontrolom.

1 µM PFOA			
Gen	**log2FC**	**FC**	**FDR**
GALNT4	–5,88	0,017	$1{,}37 \times 10^{-07}$
TP53TG3C	–5,08	0,029	$1{,}04 \times 10^{-04}$
CT47A1	–4,44	0,046	$3{,}17 \times 10^{-03}$
TRIM73	–4,34	0,049	$4{,}77 \times 10^{-03}$
MMP24-AS1–EDEM2	–4,30	0,051	$5{,}60 \times 10^{-03}$
10 µM PFOA			
Gen	**log2FC**	**FC**	**FDR**
GOLGA8K	–8,09	0,004	$8{,}11 \times 10^{-04}$
TP53TG3C	–5,10	0,029	$5{,}49 \times 10^{-05}$
CCDC169–SOHLH2	–4,88	0,034	$2{,}22 \times 10^{-04}$
SMIM10L2A	–4,32	0,050	$3{,}65 \times 10^{-03}$
APOBEC2	–4,32	0,050	$3{,}65 \times 10^{-03}$
100 µM PFOA			
Gen	**log2FC**	**FC**	**FDR**
TP53TG3	–5,03	0,031	$7{,}57 \times 10^{-05}$
CCDC169–SOHLH2	–4,89	0,034	$1{,}82 \times 10^{-04}$
TNFAIP8L2–SCNM1	–4,70	0,039	$5{,}35 \times 10^{-04}$
PCDHGA12	–4,49	0,045	$1{,}53 \times 10^{-03}$
MMP24-AS1–EDEM2	–4,32	0,050	$3{,}14 \times 10^{-03}$

5.2.17. Identifikacija molekulskih funkcija povezanih sa diferencijalno eksprimiranim genima u EA.hy926 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini

Identifikacija molekulskih funkcija povezanih sa DEG-ovima u izvršena je, kao i kod PFOS-a, pomoću online alata ShinyGO 0.80. Rezultati prikazani u tabeli 5.2.3 ukazuju na to da kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija PFOA-i dovodi do koncentraciono-zavisnih promena u molekulskim funkcijama, pri čemu se jasno razlikuju efekti niže (1 μM) i visoke (100 μM) koncentracije. Srednja koncentracija PFOA-e (10 μM) nije značajno uticala na molekulske funkcije u EA.hy926 ćelijama. Detaljnije, pri niskoj koncentraciji PFOA-e (1 μM) identifikovan je ograničen broj obogaćenih molekulskih funkcija, koje se uglavnom odnose na hromatinsku organizaciju i interakcije sa DNK. Pri ovoj koncentraciji uočeno je obogaćenje molekulskih funkcija kao što su vezivanje za nukleozomsku DNK i strukturna komponenta hromatina, sa relativno malim brojem DEG-ova, ali uz statistički značajne vrednosti FDR-a. Nasuprot tome, pri visokoj koncentraciji PFOA-e (100 μM) primećen je značajno širi i kompleksniji molekulski odgovor, koji uključuje veliki broj gena i signalnih puteva sa statistički značajnim vrednostima FDR-a. Dominantno su zastupljene molekulske funkcije povezane sa regulacijom transkripcije i interakcijom sa DNK, uključujući specifično vezivanje za DNK sekvence *cis*-regulatornih regiona (41 gen), specifično vezivanje za dvolančanu DNK (46 gena), aktivnost transkripcionog aktivatora koji se vezuje za DNK, specifična za RNK polimerazu II (19 gena), kao i aktivnost regulatora transkripcije (47 gena). Ove kategorije obuhvataju desetine gena i veliki broj gena signalnih puteva, uz veoma niske vrednosti FDR-a. Veliki broj gena u ovim kategorijama (do 59 gena kod opšteg vezivanja za DNK) ukazuje na snažnu aktivaciju regulatornih mreža i potencijalno globalnu promenu profila genske ekspresije. Pri 100 μM PFOA-i uočene su i funkcije povezane sa strukturnom komponentom ekstracelularnog matriksa (9 gena), što može ukazivati na promene u interakcijama između ćelija i ECM-a, kao i aktivnosti enzima uključenih u metabolizam lipida (1-acilglicerofosfoetanolamin O-aciltransferaza i 1-acilglicerofosfoserin O-aciltransferaza), te aktivnost ATP receptora povezanog sa G-proteinom, što može odražavati poremećaje u signalnim putevima i lipidnoj homeostazi. U celini, ovi rezultati ukazuju da PFOA pri visokoj koncentraciji indukuje koordinisan i široko rasprostranjen transkripcioni odgovor u EA.hy926 ćelijama, koji zahvata regulatorne elemente DNK, transkripcione faktore i hromatinsku arhitekturu, dok su efekti pri nižoj koncentraciji ograničeni, pre svega, na strukturne aspekte hromatina.

Tabela 5.2.3. Funkcionalna obogaćenja (GO Molekulske funkcije) diferencijalno eksprimiranih gena u EA.hy926 ćelijama nakon 48 h izlaganja perfluorooktanskoj kiselini (1, 10 i 100 µM).

1 µM PFOA			
GO Molekulske funkcije	**Broj gena**	**Geni signalnog puta**	**FDR**
Vezivanje za nukleozomsku DNK	3	41	$2{,}5 \times 10^{-02}$
Strukturna komponenta hromatina	5	107	$3{,}0 \times 10^{-03}$

100 µM PFOA			
GO Molekulske funkcije	**Broj gena**	**Geni signalnog puta**	**FDR**
Aktivnost ATP receptora povezanog sa G-proteinom	2	3	$2{,}3 \times 10^{-02}$
Aktivnost 1-acilglicerofosfoetanolamin O-aciltransferaze	2	4	$3{,}7 \times 10^{-02}$
Aktivnost 1-acilglicerofosfoserin O-aciltransferaze	2	4	$3{,}7 \times 10^{-02}$
Strukturna komponenta ekstracelularnog matriksa	9	187	$3{,}7 \times 10^{-02}$
Aktivnost transkripcionog aktivatora koji se vezuje za DNK, specifična za RNK polimerazu II	19	485	$2{,}9 \times 10^{-03}$
Aktivnost transkripcionog aktivatora koji se vezuje za DNK	19	489	$2{,}9 \times 10^{-03}$
Specifično vezivanje za DNK sekvence cis-regulatornih regiona	41	1278	$1{,}5 \times 10^{-04}$
Specifično vezivanje za DNK sekvence cis-regulatornih regiona RNK polimeraze II	39	1258	$3{,}5 \times 10^{-04}$
Vezivanje za hromatin	19	636	$3{,}7 \times 10^{-02}$
Specifično vezivanje za dvolančanu DNK	46	1656	$4{,}8 \times 10^{-04}$
Vezivanje za cis-regulatorne regione transkripcije	43	1597	$1{,}2 \times 10^{-03}$
Vezivanje za nukleinske kiseline u regulatornim regionima transkripcije	43	1599	$1{,}2 \times 10^{-03}$
Specifično vezivanje za DNK	47	1765	$8{,}6 \times 10^{-04}$
Vezivanje za dvolančanu DNK	46	1776	$1{,}3 \times 10^{-03}$
Aktivnost transkripcionog faktora koji se vezuje za DNK	39	1506	$4{,}0 \times 10^{-03}$
Aktivnost transkripcionog faktora koji se vezuje za DNK, specifična za RNK polimerazu II	37	1444	$6{,}5 \times 10^{-03}$
Aktivnost regulatora transkripcije	47	2056	$1{,}1 \times 10^{-02}$
Vezivanje za DNK	59	2707	$6{,}5 \times 10^{-03}$

5.2.18. Identifikacija bioloških procesa povezanih sa diferencijalno eksprimiranim genima u EA.hy926 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini

Kao i u slučaju molekulskih funkcija, identifikacija bioloških procesa povezanih sa DEG-ovima u EA.hy926 ćelijama nakon izlaganja 1, 10 i 100 μM PFOA-i izvršena je korišćenjem onlajn alata ShinyGO 0.80. Rezultati prikazani u tabeli 5.2.4 ukazuju na to da su značajno obogaćeni biološki procesi identifikovani nakon 48-časovnog izlaganja EA.hy926 ćelija 1 i 100 μM PFOA-i, dok pri koncentraciji od 10 μM nisu detektovane statistički značajne promene na nivou obogaćenja bioloških procesa.

Tabela 5.2.4. Funkcionalna obogaćenja (GO Biološki procesi) diferencijalno eksprimiranih gena u EA.hy926 ćelijama nakon 48 h izlaganja perfluorooktanskoj kiselini (1, 10 i 100 μM).

1 μM PFOA			
GO Biološki procesi	**Broj gena**	**Geni signalnog puta**	**FDR**
Formiranje nukleozoma	5	137	$4{,}2 \times 10^{-02}$

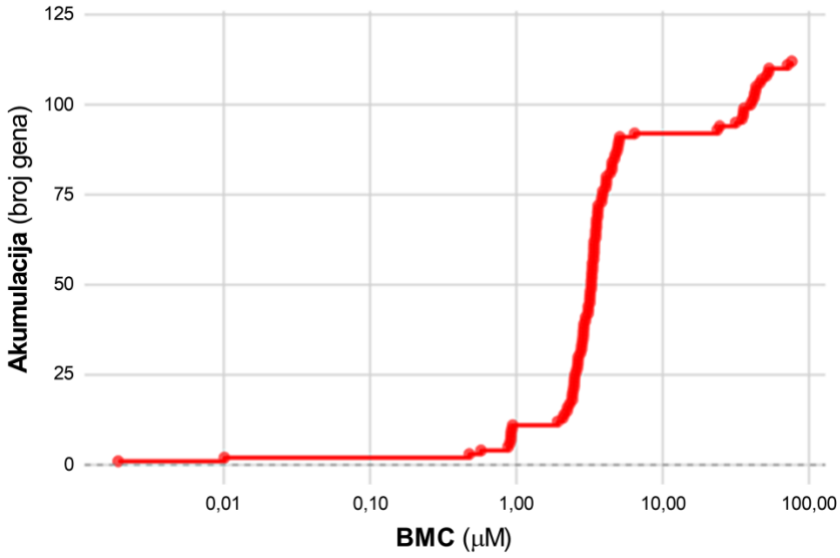
100 μM PFOA			
GO Biološki procesi	**Broj gena**	**Geni signalnog puta**	**FDR**
Morfogeneza razgranate strukture	14	9	$4{,}4 \times 10^{-04}$
Razvoj senzornog sistema	21	428	$2{,}4 \times 10^{-04}$
Morfogeneza organa životinja	36	1105	$4{,}8 \times 10^{-04}$
Razvoj epitela	41	1271	$1{,}7 \times 10^{-04}$
Razvoj tkiva	57	2086	$1{,}7 \times 10^{-04}$
Razvoj sistema	107	4617	$5{,}9 \times 10^{-06}$
Razvoj organa životinja	83	3774	$8{,}7 \times 10^{-04}$

Detaljnije, pri nižoj koncentraciji (1 μM PFOA), identifikovan je samo jedan značajno obogaćen biološki proces – formiranje nukleozoma (5 gena od ukupno 137 u signalnom putu). Ovaj nalaz sugeriše da pri nižoj koncentraciji PFOA-e primarno dolazi do promena u procesima organizacije hromatina i regulacije strukture DNK, što može ukazivati na rane epigenetičke ili transkriptomske adaptivne odgovore ćelija. Nasuprot tome, pri visokoj koncentraciji (100 μM PFOA) uočena je široka i statistički veoma značajna obogaćenost procesa povezanih sa razvojem, morfogenezom i diferencijacijom tkiva i organa. Među najznačajnijim procesima izdvajaju se: razvoj sistema (107 gena), razvoj tkiva (57 gena), razvoj epitela (41 gen), razvoj organa životinja (83 gena) i morfogeneza organa životinja (36 gena). Takođe su obogaćeni procesi vezani za morfogenezu razgranate

strukture i razvoj senzornog sistema. Ukupno posmatrano, rezultati sugerišu da je efekat PFOA-e pri niskoj koncentraciji ograničen i usmeren ka hromatinskoj organizaciji, dok pri visokoj koncentraciji dolazi do širokog poremećaja razvojnih i regulatornih bioloških procesa.

5.2.19. Modelovanje referentnih koncentracija nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini

Vrednosti BMC-ova određene su preko log2 vrednosti NRC-ova dobijenih sekvenciranjem iRNK nakon izlaganja EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 µM PFOA-i u trajanju od 48 h. Slika 5.2.19. prikazuje akumulacioni dijagram na kom se uočava koncentraciono-zavisan obrazac vrednosti BMC-ova izvedenih iz DEG-ova. Uočava se inicijalna faza u opsegu koncentracija do 3,5 µM PFOA-e, nakon čega sledi faza koordinisanog molekulskog odgovora u opsegu koncentracija od 3,5 do 8 µM PFOA-e, u kojoj dolazi do aktivacije najvećeg broja gena (~90). Vrednosti BMC-ova između 8 i ~40 µM PFOA-e karakteriše pojava efekta zasićenja (platoa), tokom kog se broj gena ne menja u značajnoj meri. Više vrednosti BMC-a, preko ~40 µM PFOA-e, dovode do naknadnog umerenog povećanja broja gena, do ukupno 112.



Slika 5.2.19. Dijagram kumulativne raspodele diferencijalno eksprimiranih gena prema vrednostima referentne koncentracije u EA.hy926 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini. Ćelije su izlagane 1, 10 i 100 µM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 µM PFOA) u trajanju od 48 h, nakon čega je određivana globalna ekspresija gena sekvenciranjem iRNK primenom platforme DNBSEQ™. Analiza BMC-ova na osnovu log2

vrednosti NRC-ova je sprovedena u programu BMDExpress v3.20.0106. Na x-osi je prikazana vrednost BMC-a (μM) na logaritamskoj skali, dok y-osa predstavlja kumulativan broj gena čije su vrednosti BMC-a jednake ili manje od odgovarajuće koncentracije. Svaka tačka na krivoj označava dodatni gen koji dostiže svoj granični odgovor na toj ili nižoj koncentraciji PFOA-e.

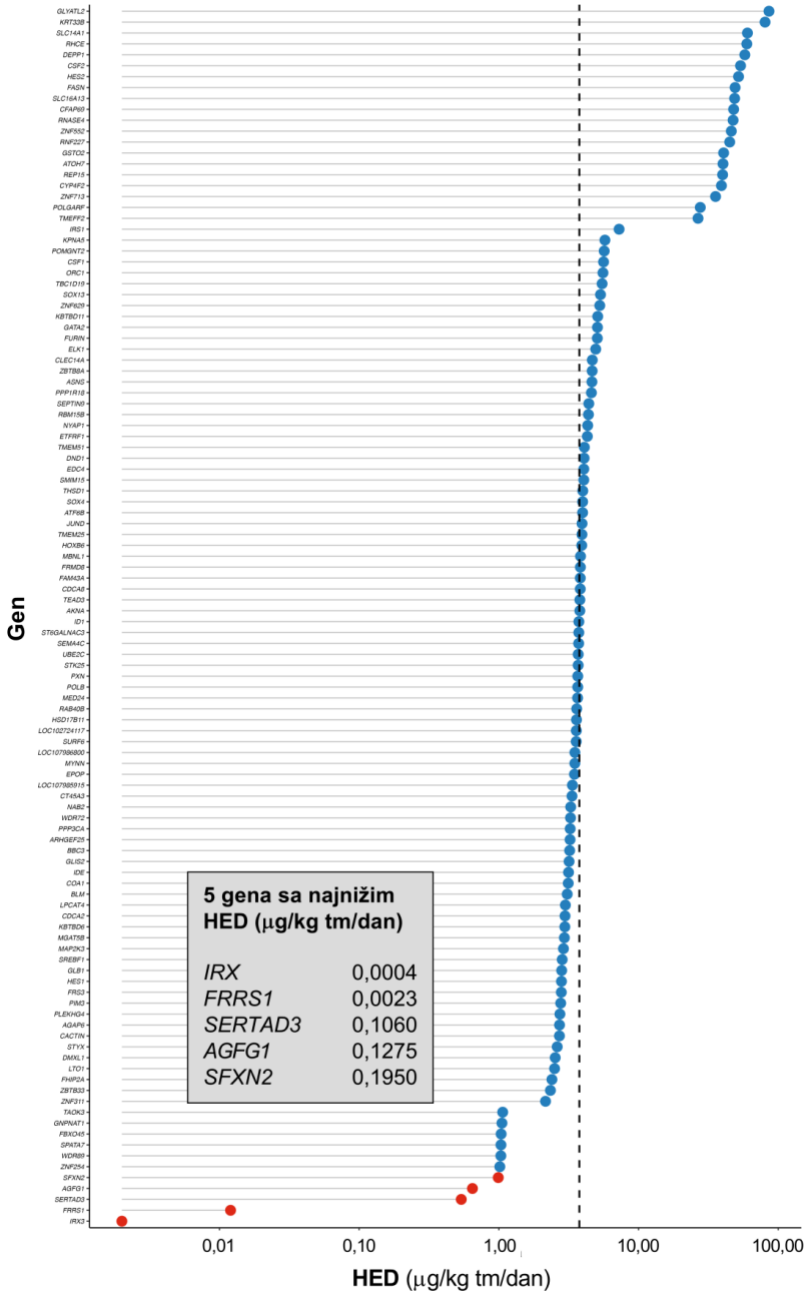
Tabela 5.2.5 prikazuje gene sa najnižim vrednostima BMC-ova, kao i pripadajućim granicama pouzdanosti BMCL i BMCU, dobijenim na osnovu transkriptomskog odgovora EA.hy926 ćelija nakon 48-časovnog izlaganja PFOA-i. Najnižu vrednost BMC-a pokazuje gen *IRX3* (engl. *iroquois homeobox 3*) (BMC = 0,0019 μM), uz izuzetno nizak BMCL (0,00018 μM) i uzak interval pouzdanosti, što ukazuje na izuzetno visoku osetljivost ovog gena na PFOA-u i vrlo rani transkripcioni odgovor pri nanomolarnim koncentracijama. Sličan obrazac uočen je i za gen *FRRS1* (engl. *ferric chelate reductase 1*) (BMC = 0,0101 μM), koji takođe pokazuje rani odgovor pri veoma niskim koncentracijama PFOA-e. Geni *SERTAD3* (engl. *SERTA domain containing 3*), *AGFG1* (engl. *Arf-GAP domain and FG repeats-containing protein 1*) i *SFXN2* (engl. *sideroflexin 2*) imaju vrednosti BMC-ova u rasponu od ~0,48 do 0,88 μM, uz šire intervale pouzdanosti kod *SERTAD3* i *AGFG1*, što ukazuje na veću varijabilnost procene praga efekta. Nasuprot tome, *SFXN2* pokazuje relativno uzak raspon između BMCL i BMCU, što sugeriše stabilniju procenu vrednosti BMC-a. Ukupno posmatrano, rezultati ukazuju da PFOA indukuje koncentraciono-zavisne promene u genskoj ekspresiji pri znatno nižim koncentracijama u poređenju sa PFOS-om, pri čemu je identifikovan skup gena koji predstavljaju najosetljivije transkriptomske markere odgovora EA.hy926 ćelija na PFOA-u.

Tabela 5.2.5. Pet gena sa najnižim vrednostima referentnih koncentracija i pripadajućim granicama pouzdanosti (BMCL i BMCU), dobijenih na osnovu koncentraciono-zavisnih promena u genskoj ekspresiji u EA.hy926 ćelijama nakon 48 h izlaganja perfluorooktanskoj kiselini (1, 10 i 100 μM).

Gen	**BMC** (μM)	**BMCL** (μM)	**BMCU** (μM)
IRX3	0,0019	0,00018	0,0020
FRRS1	0,0101	0,0015	0,0103
SERTAD3	0,477	0,129	2,773
AGFG1	0,573	0,118	1,810
SFXN2	0,877	0,806	0,968

5.2.20. Modelovanje ekvivalentne doze za čoveka nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija perfluorooktanskoj kiselini

Dobijene vrednosti BMC-ova su u daljem koraku korišćene kao ulaz u PBTK model za izračunavanje HED-a (µg/kg tm/dan) za svaki gen. Od svih vrednosti HED-ova za pojedinačne gene izračunata je P50, koja iznosi 0,538 µg/kg tm/dan. Na slici 5.2.20 su prikazane vrednosti HED-ova za analizirane gene u vidu rangiranog dijagrama tačaka sa linijama.



Slika 5.2.20. Dijagram tačaka sa linijama vrednosti ekvivalentne doze za čoveka za pojedinačne gene u EA.hy926 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini.

Vrednosti BMC-ova određene na osnovu promena u ekpresiji gena dobijenih sekvenciranjem iRNK (platforma DNBSEQ™) nakon izlaganja ćelija 1, 10 i 100 μM PFOA-i ili rastvaraču (0,05% DMSO; 0 μM PFOS) u trajanju od 48 h korišćene su kao ulaz u PBTK model za izračunavanje HED-a (μg/kg tm/dan) za svaki gen. Svaka tačka označava vrednost HED-a za pojedinačni gen, a horizontalne linije omogućavaju lakše vizuelno poređenje među genima. Isprekidana linija označava P50 vrednost HED-ova svih gena. Crvenom bojom istaknuto je pet gena sa najnižim vrednostima HED-a. U sivom panelu prikazane su tačne numeričke vrednosti HED-ova za ovih pet gena.

Na slici je posebno istaknuto pet gena sa najnižim vrednostima HED-ova. Najniži HED pokazuje gen *IRX* (0,0004 μg/kg tm/dan), za kojim sledi *FRRS1*, sa nešto višim HED-om (0,0023 μg/kg tm/dan). Tri gena, *SERTAD3*, *AGFG1* i *SFXN2*, pokazuju slične vrednosti HED-ova u rasponu od 0,106–0,195 μg/kg tm/dan.

5.2.21. Procena rizika izloženosti perfluorooktanskoj kiselini za različite populacije zasnovana na promenama u ekspresiji gena u endotelnim ćelijama

U cilju procene potencijalnog rizika izloženosti PFOA-i na promene u ekspresiji gena u endotelnim ćelijama, dobijene vrednosti HED-ova integrisane su sa podacima o izloženosti različitih populacija primenom metrike BER. Rezultati prikazani u tabeli 5.2.6 ukazuju na izraženu varijabilnost u proceni rizika između analiziranih populacija. Vrednosti HED-a za gene (P50 = 0,538 μg/kg tm/dan; P5 = 0,146 μg/kg tm/dan) korišćene su kao referentne tačke za izračunavanje BER-ova u odnosu na procenjenu izloženost u svakoj populaciji.

Detaljnije, u opštim populacijama (G1–G9) uočene su visoke vrednosti BER-ova, koje se u najvećem broju slučajeva kreću iznad 100, a u populaciji G5 dostiže i vrednost iznad 1000. Najviše vrednosti BER-ova zabeležene su u populacijama sa najnižom procenjenom izloženošću (npr. G5), što ukazuje na veliku marginu između biološki aktivnih doza koje izazivaju promene u ekspresiji gena u endotelnim ćelijama i realne izloženosti. Ovi rezultati sugerišu nizak potencijalni rizik za aktivaciju analiziranih gena u endotelnim ćelijama u opštoj populaciji. Nasuprot tome, u profesionalno izloženim populacijama (O1–O5) vrednosti BER-ova su značajno niže i u većini slučajeva su ispod 100, a u pojedinim populacijama i ispod 1. Najniže vrednosti BER-ova zabeležene su u populacijama O1, O2 i O5, gde se vrednosti BER_{P50} kreću u opsegu od 0,8 do 2,6, dok vrednosti BER_{P5} dodatno opadaju na između 0,2 i 0,7. Ovakve vrednosti ukazuju na izrazito smanjenu marginu između biološki aktivnih doza koje izazivaju promene u ekspresiji gena u endotelnim ćelijama i

realne izloženosti, odnosno na potencijalno visok rizik, s obzirom da vrednosti BER-a manje od 1 sugerišu preklapanje između nivoa izloženosti i koncentracija koje izazivaju biološki odgovor. U populacijama O3 i O4 uočene su nešto više vrednosti BER-ova u odnosu na ostale profesionalno izložene grupe (BER_{P50}: 12,6–24; BER_{P5}: 3,4–6,6), ali i dalje značajno niže u poređenju sa opštim populacijama. Ove vrednosti ukazuju na postojanje ograničene margine izloženosti i potencijalno povećan rizik, naročito kada se uzmu u obzir konzervativnije procene zasnovane na vrednosti P5, koje reflektuju najosetljivije gene.

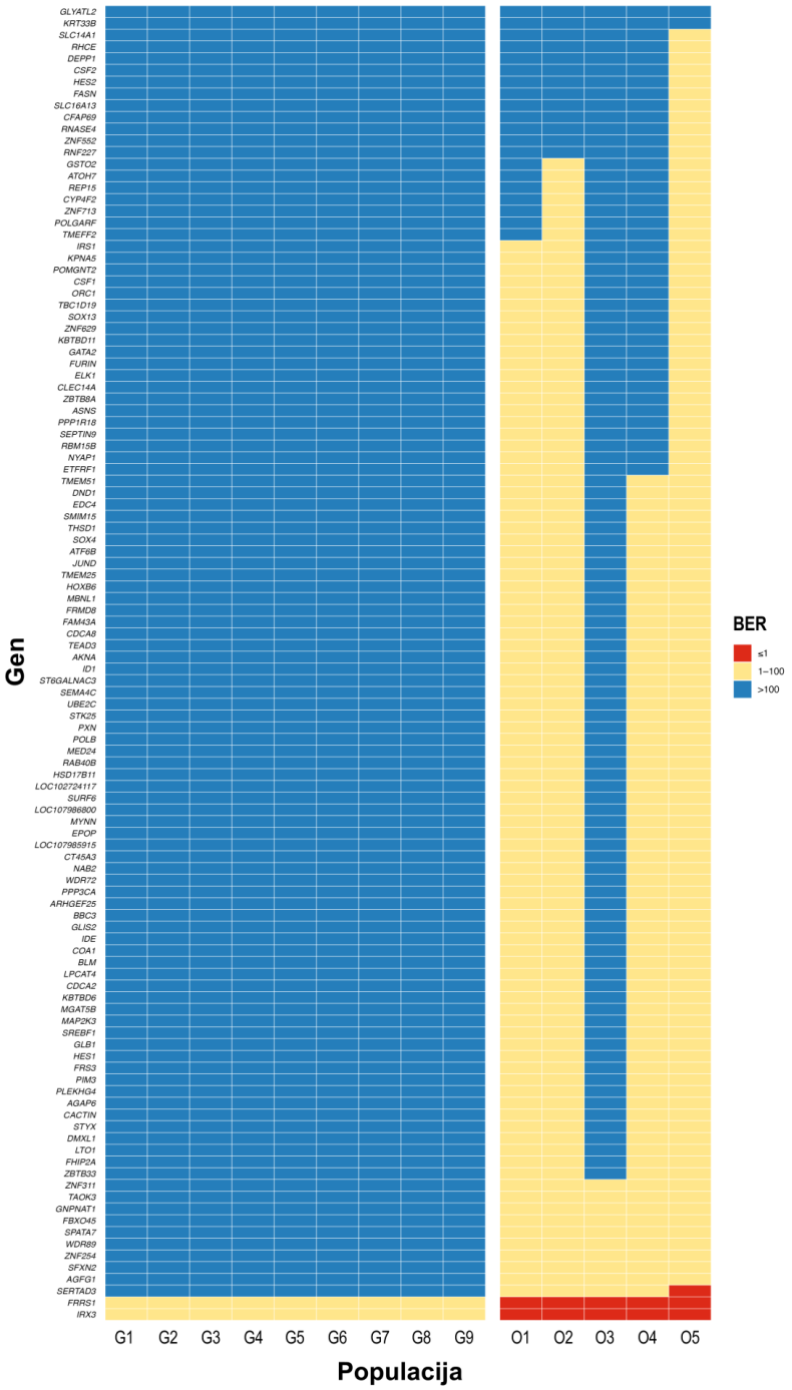
Tabela 5.2.6. Vrednosti odnosa bioaktivne doze i izloženosti perfluorooktanskoj kiselini izračunate na osnovu P50 (0,538 μg/kg tm/dan) i P5 (0,146 μg/kg tm/dan) vrednosti ekvivalentne doze za čoveka za sve analizirane gene za opšte (G1–G9) i profesionalno izložene populacije (O1–O5). HED-ovi populacija predstavljaju procenjenu dnevnu izloženost (μg/kg tm/dan). Niže vrednosti BER-ova ukazuju na smanjenu marginu izloženosti i potencijalno povećan rizik. Vrednosti BER-a <100 istaknute su podebljano.

HED gena (μg/kg tm/dan)	**Populacija**	**HED_{P50} populacija** (μg/kg tm/dan)	**BER_{P50}**	**BER_{P5}**
	G1	0,00060	896	243
	G2	0,00067	803	218
	G3	0,00077	699	190
	G4	0,00139	388	105
	G5	0,00034	1564	425
	G6	0,00056	954	259
P50: 0,538	G7	0,00084	638	173
P5: 0,146	G8	0,00114	474	129
	G9	0,00073	740	201
	O1	0,209	**2,6**	**0,7**
	O2	0,428	**1,3**	**0,3**
	O3	0,0222	**24**	**6,6**
	O4	0,0428	**12,6**	**3,4**
	O5	0,637	**0,8**	**0,2**

Poređenje vrednosti BER_{P50} i BER_{P5} pokazuje konzistentan trend smanjenja BER-ova pri korišćenju P5 HED-ova, što dodatno naglašava značaj najosetljivijih

transkriptomskih odgovora u proceni rizika. U svim analiziranim populacijama vrednosti BER_{P5} su niže od odgovarajućih BER_{P50}, pri čemu su razlike naročito izražene u profesionalno izloženim grupama, gde dodatno ukazuju na potencijalno nepovoljnije scenarije izloženosti.

Rezultati prikazani na slici 5.2.21 dodatno ilustruju ove razlike na nivou pojedinačnih gena i populacija.



Slika 5.2.21. Toplotna mapa vrednosti odnosa bioaktivne doze i izloženosti perfluorooktanskoj kiselini za pojedinačne gene na nivou analiziranih populacija. Vrednosti BER-ova su izračunate

kao odnos između vrednosti HED-a po genu (μg/kg tm/dan) i procenjene izloženosti za svaku populaciju (μg/kg tm/dan), pri čemu su populacije podeljene na opšte (G1–G9) i profesionalno izložene (O1–O5). Vrednosti BER-ova prikazane su kategorizovano: crvena boja označava BER ≤ 1 (potencijalno visok rizik), žuta boja BER u opsegu 1–100 (umerena margina izloženosti), dok plava boja označava BER > 100 (niska verovatnoća rizika).

Toplotna mapa vrednosti BER-ova ukazuje na heterogenost odgovora, pri čemu određeni geni pokazuju znatno niže vrednosti BER-ova u pojedinim populacijama, posebno u uslovima povećane profesionalne izloženosti. Kao što se može uočiti na slici, u opštim populacijama dominiraju visoke vrednosti BER-a (plava boja), što ukazuje na postojanje značajne margine između biološki aktivnih doza koje izazivaju promene u ekspresiji gena u endotelnim ćelijama i realne izloženosti. Za najveći broj analiziranih gena u ovim populacijama vrednosti BER-a su iznad 100, što sugeriše nisku verovatnoću da trenutni nivoi izloženosti PFOA-i dovedu do aktivacije transkriptomskih promena u endotelnim ćelijama. Izuzetak su geni *IRX* i *FRRS1*, koji pokazuju umerene vrednosti BER-ova u rasponu od 1–100 (žuta boja) u svim opštim populacijama. Nasuprot tome, u profesionalno izloženim populacijama uočava se značajno drugačiji obrazac. Kod velikog broja gena vrednosti BER-ova prelaze iz plave u žutu zonu (1–100), što ukazuje na smanjenu marginu izloženosti i potencijalno povećan rizik. Ovaj trend je naročito izražen u populacijama O1, O2 i O5, gde se za većinu gena beleže vrednosti BER-ova u opsegu 1–100. Populacija O3 pokazuje nešto povoljniji profil u odnosu na ostale profesionalno izložene grupe, sa većim udelom gena u plavoj zoni (BER > 100), što ukazuje na veću marginu izloženosti. Međutim, i u ovoj populaciji prisutne su vrednosti BER-ova u opsegu 1–100, što sugeriše da rizik nije zanemarljiv. Posebno je značajno da geni sa najnižim vrednostima HED-ova (npr. *IRX* i *FRRS1*) pokazuju i najniže vrednosti BER-ova (≤ 1) u svim profesionalno izloženim populacijama, što ukazuje na preklapanje između procenjene izloženosti i biološki aktivnih doza, odnosno na potencijalno visok rizik za promene u ekspresiji ovih gena. Ukupno posmatrano, ovi nalazi sugerišu da profesionalna izloženost PFOA-i može predstavljati relevantan faktor rizika za narušavanje funkcije endotela, naročito kada se razmatraju najosetljiviji molekularni odgovori na nivou pojedinačnih gena, poput *IRX* i *FRRS1*.

6. DISKUSIJA

Endotelne ćelije predstavljaju ključnu barijeru između krvi i tkiva, a njihova disfunkcija osnova je za razvoj ateroskleroze i mnogih KVB koje se zasnivaju na aterosklerotskim promenama krvnih sudova. Iako uobičajeno nisu u fokusu toksikoloških istraživanja, endotelne ćelije predstavljaju prvu tačku kontakta sa hemikalijama prisutnim u cirkulaciji. Istovremeno, toksikološki profili i mehanizmi delovanja velikog broja supstanci, uključujući PFAS, i dalje su nedovoljno razjašnjeni. Sve veći broj epidemioloških studija ukazuje na povezanost izloženosti PFAS sa različitim oboljenjima i poremećajima (Poston, 2019; Zeng i sar., 2019; Cui i sar., 2022), što dodatno naglašava potrebu za razumevanjem molekulskih mehanizama njihovog delovanja. U tom kontekstu, identifikacija ranih ćelijskih i molekulskih odgovora, kao i njihova kvantitativna translacija u biološki aktivne doze relevantne za izloženost ljudi, od ključnog je značaja za unapređenje procene rizika, razvoj preventivnih strategija i donošenje regulatornih mera usmerenih na smanjenje izloženosti populacije.

Savremeni pristupi u toksikologiji sve više se zasnivaju na integraciji *in vitro* i *in silico* metodoloških pristupa koji omogućavaju mehanističko i kvantitativno razumevanje toksičnosti. Posebno značajnu ulogu ima toksikogenomika, koja omogućava analizu promena u ekspresiji gena i identifikaciju signalnih puteva uključenih u ćelijski odgovor na izlaganje hemikalijama. Ovakav pristup omogućava detekciju ranih molekulskih događaja koji prethode razvoju patoloških promena, uključujući procese povezane sa endotelnom disfunkcijom i aterosklerozom. Istovremeno, primena PBTK modelovanja omogućava kvantitativno prevođenje eksperimentalnih nalaza dobijenih u uslovima *in vitro* u realne scenarije izloženosti kod ljudi. Integracija ovih pristupa predstavlja ključni korak ka savremenoj proceni rizika, jer omogućava prelaz sa deskriptivnih bioloških odgovora na kvantitativne metrike izloženosti relevantne u regulatornom kontekstu, čime se unapređuje osnova za donošenje naučno utemeljenih odluka.

Rezultati proistekli iz ove doktorske disertacije predstavljaju značajan naučni doprinos koji objedinjuje *in vitro* i *in silico* metodološke pristupe u proceni rizika hemikalija iz radnog i životnog okruženja, sa fokusom na razvoj disfunkcije endotela. Posebna pažnja usmerena je na efekte mikromolarnih koncentracija PFOS-a i PFOA-e nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija. Dobijeni nalazi doprinose boljem razumevanju funkcijskih i transkriptomskih odgovora endotelnih ćelija na izlaganje ovim jedinjenjima, ukazujući na potencijalne molekulske mehanizme putem kojih PFAS mogu doprineti razvoju KVB.

Integrisani pristup primenjen u ovom istraživanju omogućava sveobuhvatnije sagledavanje biološkog delovanja PFAS i predstavlja važan korak ka unapređenju savremenih strategija procene rizika i očuvanja javnog zdravlja. Istovremeno, ovaj pristup pruža fleksibilnu i efikasnu platformu za skrining velikog broja hemijskih supstanci, naročito u situacijama kada su dostupni toksikološki podaci ograničeni. U tom smislu, rezultati ove doktorske disertacije doprinose pomeranju paradigme u proceni rizika PFAS, od deskriptivnog pristupa zasnovanog na eksperimentima sa visokim koncentracijama ispitivane supstance ka mehanistički utemeljenom i kvantitativno orijentisanom okviru, koji omogućava pouzdaniju procenu rizika u uslovima realne izloženosti ljudi.

6.1. Efekti kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu u EA.hy926 ćelijama

Perfluorooktansulfonat predstavlja jedno od najčešće korišćenih jedinjenja iz grupe PFAS, a epidemiološke studije ga povezuju sa širokim spektrom negativnih efekata, uključujući hepatotoksičnost, neurotoksičnost, reproduktivnu i plućnu toksičnost, imunosupresiju, oštećenje funkcije bubrega, poremećaje u funkciji štitaste žlezde i povećan rizik za razvoj KVB (Kataria i sar., 2015; Zeng i sar., 2019; Espartero i sar., 2022). Uprkos tome, mehanizam delovanja PFOS-a na nivou vaskularnog endotela nije u potpunosti razjašnjen. Uzimajući to u obzir, u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivan je uticaj kratkotrajnog izlaganja 1, 10 i 100 μM PFOS-u na funkcijske i transkriptomske promene u EA.hy926 ćelijama koje se mogu dovesti u vezu sa disfunkcijom endotela.

6.1.1. Funkcijski odgovori EA.hy926 ćelija nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu

Metabolička aktivnost ćelija nakon kratkotrajnog izlaganja mikromolarnim koncentracijama PFOS-a određivana je primenom testa sa bojom alamarBlue™, koji predstavlja neinvazivan i osetljiv indikator vijabilnosti i funkcionalnog statusa ćelija. Nakon 24 i 48 h izlaganja nisu uočene statistički značajne promene u metaboličkoj aktivnosti, odnosno vijabilnosti ćelija. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodno objavljenim studijama na drugim ćelijskim modelima, uz napomenu da podaci za ćelijsku liniju EA.hy926 do sada nisu bili dostupni. Naime, Cui i saradnici su pokazali da izlaganje HUVEC ćelija PFOS-u u opsegu koncentracija od 1 do 500 μM tokom 12, 24 i 48 h dovodi

do koncentraciono i vremenski zavisnog odgovora na vijabilnost ćelija. Međutim, koncentracije do 100 μM nisu značajno uticale na vijabilnost ćelija, nezavisno od trajanja tretmana, dok je pri višim koncentracijama (≥220 μM) zabeležen pad vijabilnosti, sa procenjenom vrednošću IC_{50} od približno 180 μM nakon 12 h izlaganja. Takođe, autori su pokazali da PFOS može indukovati feroptozu putem regulacije signalnih puteva posredovanih GPX4 i ACSL4, što doprinosi disfunkciji endotelnih ćelija (Cui i sar., 2022). Odsustvo izraženog citotoksičnog efekta PFOS-a u okviru ovog doktorskog istraživanja dodatno je potvrđeno analizom apoptoze i nekroze primenom protočne citometrije. U tu svrhu korišćeni su aneksin V-FITC i PI. Aneksin V-FITC detektuje PS na spoljašnjoj strani ćelijske membrane, što predstavlja rani marker apoptoze, dok PI ulazi u ćelije sa narušenim integritetom membrane i označava kasne faze apoptoze i nekrozu. Dobijeni rezultati pokazuju da kratkotrajno izlaganje PFOS-u nije dovelo do povećanja broja apoptotičnih niti nekrotičnih ćelija, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim testom sa bojom alamarBlue™. Pored toga, analizirana je i raspodela ćelija po fazama ćelijskog ciklusa korišćenjem bojenja sa PI-om. Rezultati su pokazali da mikromolarne koncentracije PFOS-a ne utiču značajno na distribuciju ćelija u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa. Iako su ovi nalazi u izvesnoj meri u suprotnosti sa rezultatima drugih studija, u kojima je pokazano da izlaganje PFOS-u (1–10 μM) može smanjiti udeo humanih epitelnih ćelija dojke u fazi G0/G1 uz povećanje udela ćelija u fazi S (Pierozan i Karlsson, 2018; Pierozan i sar., 2020), treba naglasiti da do sada nisu sprovedena slična istraživanja na makrovaskularnoj endotelnoj ćelijskoj liniji EA.hy926. Ukupno posmatrano, dobijeni rezultati ukazuju da kratkotrajno izlaganje mikromolarnim koncentracijama PFOS-a ne dovodi do izraženih citotoksičnih efekata niti narušava osnovne parametre ćelijske homeostaze u EA.hy926 ćelijama. Ovi nalazi sugerišu da se potencijalni efekti PFOS-a u ovom modelu verovatnije manifestuju na nivou suptilnijih molekulskih i funkcijskih promena, a ne kroz direktnu citotoksičnost.

Parametri funkcije EA.hy926 ćelija, uključujući migraciju, adheziju za proteine ECM-a i angiogeni potencijal, ispitivani su nakon 48-časovnog izlaganja PFOS-u (1, 10 i 100 μM). Dobijeni rezultati pokazuju da ove koncentracije PFOS-a nisu značajno uticale na migraciju endotelnih ćelija, dok je pri najvišoj koncentraciji (100 μM) uočeno značajno povećanje adhezije ćelija za fibronektin, uz istovremeno smanjenje formiranja endotelnih tubula. Migracija i adhezija endotelnih ćelija predstavljaju međusobno povezane procese od ključnog značaja za angiogenezu, zarastanje rana, regeneraciju tkiva i inflamacijske

odgovore (Lamalice i sar., 2007). Izostanak promena u migraciji sugeriše da kratkotrajno izlaganje PFOS-u, čak i pri višim koncentracijama, verovatno nije dovoljno da naruši ključne mehanizme remodelovanja citoskeleta i signalne puteve koji regulišu ovaj proces. Međutim, ovaj nalaz treba interpretirati uz oprez, s obzirom da su prethodne studije koje su pokazale poremećaje migracije nakon izlaganja PFOS-u uglavnom sprovedene na drugim ćelijskim modelima i pri dužem trajanju izlaganja, što ukazuje da odgovor endotelnih ćelija može zavisiti od tipa ćelija, eksperimentalnog modela i trajanja izlaganja (Li i sar., 2021; Zheng i sar., 2023). S druge strane, povećana adhezija ćelija za fibronektin može delimično objasniti i odsustvo promena u migraciji i smanjen angiogeni potencijal. Pojačane interakcije između ćelija i proteina ECM-a mogu dovesti do stabilizacije ćelijskog prianjanja, smanjenja dinamike citoskeleta i posledično ograničenja migratorne sposobnosti i formiranja kapilarnih struktura. U skladu s tim, u ovom istraživanju je pokazano da najviša koncentracija PFOS-a (100 μM) ima negativan efekat na angiogenezu, što se ogleda u smanjenoj sposobnosti formiranja endotelnih tubula. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa rezultatima drugih studija koje ukazuju na antiangiogeni potencijal PFOS-a. Na primer, Forsthuber i saradnici (2022) su u 3D *in vitro* modelu angiogeneze, zasnovanom na kokulturi normalnih fibroblasta debelog creva i HUVEC ćelija, pokazali da PFOS dovodi do dozno-zavisnog smanjenja više parametara angiogeneze. Slični rezultati dobijeni su i u studiji Li i saradnika (2021), u kojoj su korišćene ćelijske linije placentalnog porekla (HTR-8/SVneo i JEG-3). Pored toga, u ovom doktorskom istraživanju uočeno je smanjenje ekspresije ključnih markera angiogeneze, uključujući VEGF-A, VEGFR-2 i PECAM-1. VEGF-A ima centralnu ulogu u regulaciji angiogeneze, s obzirom da vezivanje VEGF-A za VEGFR-2 aktivira signalne puteve koji kontrolišu proliferaciju, migraciju i preživljavanje endotelnih ćelija, kao i formiranje novih krvnih sudova (Abhinand i sar., 2016). Stoga istovremeno smanjenje ekspresije VEGF-A i VEGFR-2 ukazuje na inhibiciju angiogenih signalnih puteva. Slični efekti, uključujući inhibiciju signalnog puta posredovanog VEGFR-2 i smanjeno formiranje endotelnih tubula, opisani su i u drugim studijama (Forsthuber i sar., 2022; Ashby i sar., 2024), što dodatno potvrđuje da kratkotrajno izlaganje visokim koncentracijama PFOS-a može dovesti do ranih poremećaja angiogeneze u humanim makrovaskularnim endotelnim ćelijama.

U eksperimentu vezivanja humanih monocita U937 za EA.hy926 ćelije simulirana je interakcija monocita i endotelnih ćelija u uslovima sličnim *in vivo* okruženju krvnih sudova, primenom *in vitro* pristupa. Dobijeni rezultati pokazali su da 48-časovno izlaganje

EA.hy926 ćelija mikromolarnim koncentracijama PFOS-a ne utiče značajno na vezivanje monocita za endotelni monosloj, niti na ekspresiju ključnih adhezivnih molekula ICAM-1, VCAM-1 i E-selektina. Ovi nalazi nisu u potpunosti u skladu sa rezultatima drugih autora (Liao i sar., 2012), što se može objasniti razlikama u eksperimentalnim uslovima, pre svega u pogledu korišćenih ćelijskih modela i viših koncentracija PFOS-a u prethodnim studijama. Stoga se može pretpostaviti da koncentracije PFOS-a primenjene u ovom istraživanju nisu dovoljne da indukuju izražen proinflamacijski odgovor endotelnih ćelija koji bi doveo do povećane adhezije monocita. Dodatno, u ovom istraživanju je pokazano da kratkotrajno izlaganje PFOS-u ne utiče značajno na propustljivost endotelne barijere, niti na ekspresiju proteina koji ulaze u sastav TJ, uključujući okludin i ZO-1. Ovi rezultati ukazuju na očuvan integritet endotelne barijere u datim eksperimentalnim uslovima. Međutim, treba naglasiti da dostupna literatura ukazuje na potencijal PFOS-a da utiče na signalne puteve uključene u regulaciju citoskeleta i međućelijskih veza. Posebno su značajne male GTPaze iz porodica Rho i Rap, koje imaju ključnu ulogu u kontroli ćelijske adhezije, integriteta barijere i TEM-a leukocita (Cerutti i Ridley, 2017). U skladu sa tim, pojedine studije su pokazale da PFOS može narušiti integritet endotelne barijere. Tako su Wang i saradnici (2011) pokazali da PFOS dovodi do destabilizacije TJ u humanim mikrovaskularnim endotelnim ćelijama mozga (engl. *human brain microvascular endothelial cells*, HBMEC) i povećanja permeabilnosti putem aktivacije signalnog puta fosfatidilinozitol-3 kinaze (engl. *phosphoinositide 3-kinases*, PI3K). Slično tome, Qian i saradnici (2010) su pokazali da PFOS u HMVEC povećava produkciju ROS-a, izaziva remodelovanje aktinskog citoskeleta i povećava paracelularnu permeabilnost na dozno-zavisan način. Ovi nalazi ukazuju da PFOS može modifikovati funkciju endotela putem više mehanizama, uključujući indukciju oksidativnog stresa, promene u signalnim putevima i reorganizaciju citoskeleta, što može dovesti do povećane propustljivosti i olakšane adhezije imunskih ćelija. U tom kontekstu, povezanost između povećane permeabilnosti endotela i adhezije monocita dodatno je potvrđena u studiji Liao i saradnika (2012), u kojoj je pokazano da izlaganje HUVEC visokim koncentracijama PFOS-a (50 i 100 mg/L) dovodi do povećanog stvaranja ROS-a, pojačane ekspresije CAM-ova i povećane adhezije leukocita. Međutim, važno je naglasiti da su u ovom doktorskom istraživanju korišćene niže koncentracije PFOS-a i kraće vreme izlaganja, što verovatno objašnjava odsustvo detektovanih promena u propustljivosti i vezivanju monocita. Dobijeni rezultati stoga ukazuju da mikromolarne koncentracije PFOS-a, pri kratkotrajnom izlaganju, nisu dovoljne da indukuju inflamacijski odgovor niti naruše integritet endotelne barijere u EA.hy926 ćelijama. Zbirno, ovi nalazi sugerišu da su za

pojavu izraženijih funkcijskih promena, poput povećane permeabilnosti endotela i adhezije monocita, verovatno potrebni viši nivoi izloženosti i/ili duži periodi izlaganja. Istovremeno, rezultati ukazuju da izostanak efekta u akutnim uslovima ne isključuje mogućnost nastanka promena tokom dugotrajne, hronične izloženosti ili u kompleksnijim uslovima *in vivo*, što predstavlja važan pravac za buduća istraživanja.

Perfluorooktansulfonat je u relativno ograničenom broju studija opisan kao supstanca koja ispoljava štetne efekte na nivou endotela i KVS-a u celini. U uslovima *in vitro*, na HMVEC, pokazano je da izlaganje višim (od 10 do 100 μM) i nižim koncentracijama (2 i 5 μM) PFOS-a povećava nivo ROS-a i dovodi do remodelovanja aktinskog citoskeleta (Qian i sar., 2010). Cui i saradnici (2022) su na modelu HUVEC pokazali da PFOS dovodi do povećanog stvaranja ROS-a, morfoloških promena u mitohondrijama i smanjene sinteze NO-a, dok su Liao i saradnici (2012) otkrili da PFOS povećava stvaranje ROS-a, podstiče inflamaciju preko povećane ekspresije gena za IL-1β, IL-6, COX-2, eNOS, ICAM-1 i P-selektin i povećava adheziju monocita za HUVEC. Ovi nalazi su mehanistički u skladu sa opštim modelom endotelne disfunkcije, prema kojem ROS-a, pretežno poreklom od izoformi NADPH oksidaza (NOX) narušavaju integritet endotelne barijere, podstiču inflamacijske procese i doprinose vaskularnom remodelovanju (Drummond i Sobey, 2014). Dodatno, PFOS se u *in vivo* modelima dovodi u vezu sa smanjenom relaksacijom krvnog suda zavisnom od endotela, poremećajima u signalizaciji preko NO-a, porastom krvnog pritiska tokom trudnoće i smanjenjem vaskularne reaktivnosti (Dangudubiyyam i sar., 2020; Dangudubiyyam i sar., 2022; Dangudubiyyam i sar., 2023), što potvrđuje fiziološku relevantnost nalaza dobijenih u uslovima *in vitro*. Takođe, antiangiogeni efekti PFOS-a potvrđeni su u 3D ko-kulturama HUVEC ćelija, gde je uočena inhibicija formiranja kapilarnih struktura, verovatno putem poremećaja signalizacije povezane sa NO-om, VE-kadherinom i migracijom ćelija (Forsthuber i sar., 2022). Konačno, hronična izloženost PFOS-u može da ubrza aterogenezu (npr. u *in vivo* modelima ateroskleroze), što sugeriše postojanje kompleksne mreže prooksidativnih i inflamacijskih mehanizama (Wang i sar., 2023). Suprotno ovim nalazima, u okviru ovog doktorskog istraživanja nije zabeležen porast nivoa ROS-a nakon 48-časovnog izlaganja EA.hy926 ćelija mikromolarnim koncentracijama PFOS-a. Ovakav rezultat može imati više objašnjenja. Pre svega, razlike u odnosu na literaturne podatke mogu se pripisati tipu korišćenog ćelijskog modela. EA.hy926 ćelijska linija, kao hibridna endotelna linija, razlikuje se od primarnih HUVEC i HMVEC ćelija u pogledu bazalne antioksidativne i

metaboličke aktivnosti, što može uticati na odgovor na oksidativni stres. Dalje, razlike u eksperimentalnim uslovima, naročito u pogledu koncentracije i trajanja izlaganja, mogu značajno uticati na detekciju ROS-a. U ranijim studijama povećanje ROS-a često je zabeleženo u ranim vremenskim tačkama (minuti do nekoliko sati), dok produženo izlaganje (do 48 h), kao u ovom istraživanju, može dovesti do aktivacije kompenzatornih antioksidativnih mehanizama i normalizacije redoks statusa ćelija. Takođe, treba imati u vidu da izvori ROS-a u endotelnim ćelijama mogu biti različiti. NADPH oksidaze, posebno izoforme NOX2 i NOX4, predstavljaju značajan izvor ROS-a u endotelu, ali njihova aktivacija zavisi od specifičnih stimulusa i mikrookruženja, uključujući prisustvo citokina, faktora rasta (npr. VEGF) i mehaničkih sila poput smicanja usled protoka krvi kroz krvni sud (Frey i sar., 2009). Stoga odsustvo povećanja ukupnog nivoa ROS-a ne isključuje mogućnost lokalizovanih ili prolaznih promena u redoks signalizaciji. U cilju preciznijeg razumevanja ovih razlika, buduća istraživanja trebalo bi da uključe identifikaciju izvora ROS-a, uključujući mitohondrijske i poreklom od NOX, primenom specifičnih fluorescentnih proba poput MitoSOX i Amplex Red, redom, kao i farmakoloških inhibitora. Pored toga, u ovom istraživanju je pokazano da kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija 1, 10 i 100 μM PFOS-u ne dovodi do promena u nivou NO-a. Ovaj nalaz, zajedno sa odsustvom povećanja ROS-a, ukazuje da ispitivane koncentracije PFOS-a ne narušavaju redoks homeostazu endotela u datim eksperimentalnim uslovima. Iako je uočen trend smanjenja ekspresije gena za eNOS, ove promene nisu bile statistički značajne, niti su bile praćene promenama na nivou proteina eNOS-a ili njegove fosforilacije u ranim vremenskim tačkama. Zbirno, iako ovi rezultati odstupaju od nalaza dobijenih na drugim ćelijskim modelima, oni ukazuju da kratkotrajno izlaganje mikromolarnim koncentracijama PFOS-a ne dovodi do izražene disfunkcije EA.hy926 ćelija, niti aktivira ključne signalne puteve koji smanjuju dostupnost NO-a. Ovi nalazi dodatno naglašavaju značaj eksperimentalnog modela i uslova izlaganja u interpretaciji toksičnih efekata PFOS-a na vaskularni endotel.

Eksperimentalni pristup primenjen u ovom istraživanju ima nekoliko značajnih prednosti, ali i ograničenja koja treba uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata. Jedna od ključnih prednosti jeste upotreba humanog *in vitro* modela, koji omogućava direktno ispitivanje efekata PFOS-a na endotelne ćelije, bez brojnih faktora koji mogu uticati na interpretaciju dobijenih rezultata u epidemiološkim studijama i bez potrebe za ekstrapolacijom dobijenih rezultata između bioloških vrsta, što je karakteristično za eksperimente na životinjama. Dodatno, korišćenje stabilne i dobro okarakterisane ćelijske

linije EA.hy926 omogućava visoku reproduktivnost i kontrolu eksperimentalnih uslova, za razliku od primarnih endotelnih ćelija (npr. HUVEC), koje karakteriše ograničen proliferativni potencijal, zahtevna izolacija i izražena varijabilnost između donora (Bouïs i sar., 2001). Međutim, ovaj pristup ima i određena ograničenja. Pre svega, korišćeni model ne odražava u potpunosti kompleksnost *in vivo* uslova, uključujući interakcije između različitih tipova ćelija, hemodinamske sile i sistemske regulacione mehanizme. Takođe, kontinuirana ćelijska linija EA.hy926 može se razlikovati od primarnih endotelnih ćelija u pogledu fenotipskih i funkcijskih karakteristika (Baranska i sar., 2005), što može uticati na osetljivost na PFOS. Dodatno ograničenje predstavlja režim izlaganja, s obzirom da su u ovom istraživanju primenjene relativno visoke mikromolarne koncentracije PFOS-a tokom kratkog vremenskog perioda, koje ne odražavaju hroničnu izloženost niskim dozama ove supstance, što je karakteristično za opštu populaciju. Iako je opseg korišćenih koncentracija PFOS-a (1–100 μM) uglavnom iznad koncentracija kojima je čovek rutinski izložen i koje se mogu izmeriti u telesnim tečnostima većine ljudi (Ingelido i sar., 2025), treba naglasiti da se visoke koncentracije PFOS-a mogu detektovati u serumu ljudi u specifičnim okolnostima, kao što su akutna profesionalna izloženost u procesima proizvodnje PFAS (Wang i sar., 2012), kod vatrogasaca usled upotrebe pene za gašenje požara (Christensen i Calkins, 2023) i profesionalnih vojnika (Petersen i sar., 2025), kod radnika na aerodromima i sl., pri upotrebi visoko kontaminirane hrane i vode za piće u pojedinim regionima (Zhou i sar., 2014) i dr. Drugim rečima, ovakav pristup može biti relevantan za specifične scenarije povećane izloženosti, poput profesionalne izloženosti ili kontaminacije životne sredine. Stoga dobijeni rezultati prvenstveno odražavaju efekte akutnog izlaganja i ukazuju na rane ćelijske odgovore, dok potencijalni efekti dugotrajne izloženosti ostaju nedovoljno razjašnjeni. U tom smislu, buduća istraživanja bi trebalo usmeriti ka modelima koji uključuju produženo ili ponovljeno izlaganje nižim, nanomolarnim koncentracijama PFOS-a, kako bi se u većoj meri simulirali realni uslovi izloženosti i unapredilo razumevanje njegovih dugoročnih efekata na KVS.

6.1.2. Transkriptomski odgovori EA.hy926 ćelija nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktansulfonatu

U narednom koraku ispitivan je efekat izlaganja 1, 10 i 100 μM PFOS-u u trajanju od 48 h na globalnu ekspresiju gena, kao i na molekulske funkcije i biološke procese povezane sa DEG-ovima. Analiza DEG-ova je pokazala da sve tri ispitivane koncentracije

PFOS-a dovode do promena u ekspresiji gena, ali u različitom obimu. Najveći broj DEG-ova identifikovan je pri koncentraciji od 1 μM PFOS-a (245 gena), što ukazuje da i relativno niske koncentracije ove supstance mogu izazvati izražen transkriptomski odgovor u endotelnim ćelijama. Ovaj nalaz je u skladu sa činjenicom da je endotel prva barijera u kontaktu sa cirkulišućim ksenobioticima i da je posebno osetljiv na hemijske stresore. Pri višim koncentracijama PFOS-a (10 i 100 μM) identifikovan je manji broj DEG-ova (227 i 111, redom), što sugeriše promenu karaktera ćelijskog odgovora, pri čemu se manji broj gena uključuje u odgovor, ali sa potencijalno značajnijim funkcionalnim posledicama.

Inverzna zavisnost broja DEG-ova od primenjene koncentracije PFOS-a upućuje na postojanje nemonotonih doznih odgovora (engl. *non-monotonic dose response*, NMDR) na nivou ekspresije gena, što je fenomen dobro poznat u toksikologiji, posebno kod endokrinih ometača (Vandenberg i sar., 2012; Shioda i sar., 2013; Vandenberg, 2014). NMDR opisuje odnos između koncentracije supstance i biološkog efekta koji nije linearan, već se menja unutar određenog opsega koncentracija, pri čemu niže koncentracije mogu izazvati izraženije odgovore u odnosu na srednje ili visoke (Vandenberg, 2014). Ovaj koncept dovodi u pitanje tradicionalni toksikološki princip da „doza čini otrov" (Zoeller i Vandenberg, 2015). Nemonotoni obrasci mogu nastati kao posledica različitog afiniteta i zasićenja ciljnih mesta, aktivacije suprotstavljenih signalnih puteva, povratnih sprega, kao i promene dominantnog mehanizma delovanja sa porastom primenjene doze (Vandenberg i sar., 2012; Villar-Pazos i sar., 2017). NMDR je često prisutan kod supstanci koje deluju kao endokrini ometači, uključujući PFAS (Lagarde i sar., 2015). Iako PFOS ne spada u klasične estrogene mimetike, poznato je da može da deluje preko više molekularnih mehanizama, uključujući aktivaciju nuklearnih receptora, membranske efekte i signalne puteve zavisne od Ca^{2+}, zbog čega se može očekivati aktivacija različitih skupova regulatornih mreža i/ili kompenzatornih odgovora u zavisnosti od primenjene koncentracije. U prilog tome govore i rezultati prethodnih studija. Na primer, u studiji Stanic i saradnika (2023) prikazani su rezultati sekvenciranja iRNK celokupnog genoma EA.hy926 ćelija koje su tokom četrnaest nedelja izlagane nanomolarnim koncentracijama BPA, pri čemu je pokazano da izlaganje ćelija najnižoj koncentraciji BPA dovodi do promena u ekspresiji najvećeg broja gena. NMDR na nivou ekspresije gena nakon izlaganja niskim koncentracijama BPA je zapažen i na nekim drugim biološkim modelima, kao što je ćelijska linija MCF7 (Shioda i sar., 2013) i materica kod pacova (Leung i sar., 2020). Još neki autori su pokazali da najniže koncentracije ispitivane supstance aktiviraju ekspresiju najvećeg broja gena (Vandenberg, 2014; Park i

sar., 2021). S druge strane, postoje i studije koje ukazuju na drugačiji obrazac odgovora. Tako su Davidsen i saradnici (2022) pokazali da povećanje koncentracije PFOS-a dovodi do porasta broja DEG-ova u kardiomiocitima dobijenim iz indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija čoveka, što ukazuje da efekat PFOS-a na ekspresiju gena zavisi od tipa ćelijskog modela, odabranih koncentracija i trajanja izlaganja. Takođe, u pojedinim studijama analiza ekspresije gena zasnovana je na primeni jedne koncentracije PFOS-a (Mishra i Kumar, 2023), što dodatno naglašava značaj korišćenja šireg opsega koncentracija za precizniju i pouzdaniju interpretaciju efekata ove supstance na nivou ekspresije gena.

Važno je naglasiti da promene na nivou ekspresije gena ne moraju nužno biti praćene odgovarajućim fiziološkim efektima, što je pokazano u studiji Stanic i saradnika (2023). Do sličnih zapažanja su došli i Leung i saradnici (2020), koji su detektovali NMDR na nivou ekspresije gena, ali bez značajnih promena u funkcijskim parametrima, kao što su proliferacija, apoptoza ili histopatološke promene u materici. Ovi rezultati ukazuju da transkriptomske promene mogu predstavljati rane, adaptivne odgovore ćelija koji ne moraju odmah dovesti do funkcijskih poremećaja. Iz navedenog se može zaključiti da nivo biološke organizacije na kom se ispituju efekti hemikalija (od ekspresije gena, preko nivoa ćelija, tkiva i organa, do nivoa celokupnog organizma) značajno utiče na to da li će efekti izlaganja odabranim koncentracijama neke hemikalije biti detektovani, a zatim i kako će biti interpretirani (Vandenberg i sar., 2012).

Analiza bioloških procesa pokazala je da su statistički značajno obogaćeni procesi identifikovani pri najnižoj i najvišoj koncentraciji PFOS-a, 1 i 100 μM, dok pri koncentraciji od 10 μM PFOS-a nisu detektovane statistički značajne promene na nivou obogaćenja bioloških procesa. Pri 1 μM PFOS-u identifikovan je samo jedan značajno obogaćen biološki proces – homofilna ćelijska adhezija putem adhezivnih molekula plazma membrane, dok je pri 100 μM PFOS-u zapaženo dominantno obogaćenje bioloških procesa povezanih sa metabolizmom i katabolizmom alkohola, amina i fenolnih jedinjenja. Nalaz koji se odnosi na najnižu koncentraciju PFOS-a (1 μM) je posebno značajan, s obzirom na to da su adhezija i integritet endotelne barijere ključne za održavanje vaskularne homeostaze. U literaturi je PFOS povezan sa remodelovanjem aktinskog citoskeleta i porastom paracelularne permeabilnosti endotela, što ukazuje na narušavanje međućelijskih veza i barijerne funkcije (Qian i sar., 2010). Stoga je moguće da izlaganje endotelnih ćelija 1 μM PFOS-u inicira transkriptomsku reorganizaciju adhezivnih molekula kao rani adaptivni ili kompenzatorni odgovor, pre nego što se pojave merljive funkcijske promene. Ovo tumačenje je u skladu sa

nalazom da su među genima sa najizraženijim relativnim promenama u ekspresiji u odnosu na kontrolu identifikovani i *EFNA4–EFNA3*, koji kodiraju efrine, proteine koji su važni za kontakte ćelija, migraciju i vaskularno remodelovanje. S tim u vezi, smanjena ekspresija ovog transkripta može ukazivati na poremećaje u međućelijskoj signalizaciji i funkcionalnosti endotela. Prethodna istraživanja takođe potvrđuju da PFOS može izazvati promene u ekspresiji gena i signalnim putevima u endotelnim ćelijama, dovodeći do poremećaja u proliferaciji, ćelijskoj signalizaciji i funkciji vaskularnog endotela (Mishra i Kumar, 2023; Ashby i sar., 2024).

Među najviše eksprimiranim genima pri najnižoj (1 μM) i najvišoj (100 μM) koncentraciji PFOS-a izdvaja se i transkript *BIVM-ERCC5*. *BIVM* kodira slabo karakterisan protein, za koji se pretpostavlja da učestvuje u protein–protein interakcijama i organizaciji citoskeleta, dok je *ERCC5* uključen u procese popravke oštećenja na molekulu DNK (Koenig i sar., 2014). Povećana ekspresija fuzionog transkripta *BIVM-ERCC5* može ukazivati na aktivaciju ćelijskog odgovora na stres, posebno kroz procese popravke oštećenja DNK, imajući u vidu ključnu ulogu *ERCC5* u nukleotidnoj ekscizionoj reparaciji. U prilog značaju *ERCC5* navodi se i povezanost njegove smanjene ekspresije sa razvojem koronarne arterijske bolesti (Bai i sar., 2022). Pored toga, detektovana je i povećana ekspresija gena *TMEFF1* i *TP53TG3F*. Iako funkcija *TMEFF1* u endotelnim ćelijama još uvek nije detaljno razjašnjena, poznato je da u drugim modelima učestvuje u regulaciji proliferacije, migracije i preživljavanja ćelija, kao i u aktivaciji signalnih puteva protein kinaze aktivirane mitogenim signalima i PI3K (Nie i sar., 2019). S druge strane, povećana ekspresija *TP53TG3F* ukazuje na aktivaciju signalnog puta posredovanog tumor supresorom p53, koji predstavlja ključni regulator ćelijskog odgovora na stres i održavanja integriteta endotelne barijere (Kubra i Barabutis, 2022).

Dodatno, pri 1 μM PFOS-u je uočeno obogaćenje molekulske funkcije povezane sa vezivanjem jona kalcijuma. Kalcijum predstavlja ključni sekundarni glasnik u endotelu, uključen u regulaciju citoskeleta, propustljivosti, aktivaciju eNOS-a i brojne signalne puteve povezane sa ćelijskim odgovorom na stres (Tiruppathi i sar., 2002; Dalal i sar., 2020). Ovi rezultati ukazuju da PFOS već pri niskim koncentracijama može uticati na osnovne regulatorne mehanizme endotelnih ćelija. Postoje dokazi da PFAS, uključujući PFOS, mogu da aktiviraju signalne puteve zavisne od Ca^{2+}, poput protein kinaze C i NF-κB i da time utiču na proinflamacijsku signalizaciju i ćelijski stres (Wang i sar., 2021). U svetlu ovih razmatranja, vezivanje jona kalcijuma kao dominantna molekulska funkcija detektovana pri

najnižoj koncentraciji PFOS-a može predstavljati važan mehanistički most između uočenih transkriptomskih promena i poznatih efekata PFOS-a na funkciju endotela.

Posebno je važno razmotriti uočene promene u genima povezanim sa imunskim i citokinskim signalnim putevima, kao što su *IFNAR2–IL10RB* i *LILRB3*, kod kojih je u ovom istraživanju zabeležena smanjena ekspresija u više koncentracijskih grupa. Endotel ne predstavlja samo pasivnu barijeru između krvi i okolnih tkiva, već i imunološki aktivan organ koji integriše signale iz cirkulacije i reguliše adheziju leukocita na endotelne ćelije, njihovu TEM i lokalni inflamacijski odgovor. PFAS su u epidemiološkim i eksperimentalnim studijama povezani sa imunomodulacijom i povećanim rizikom od poremećaja imunskog odgovora, što je u skladu sa sposobnošću ovih supstanci da utiču na signalne puteve uključene u urođeni imunitet i inflamaciju (DeWitt i sar., 2019; Wang i sar., 2021). U tom kontekstu, smanjenja ekspresija pojedinih komponenti signalnog puta IFN/IL-10, kao i inhibitornih receptora, ukazuje da PFOS može da menja imunski odgovor endotela i potencijalno utiče na vaskularnu osetljivost na inflamacijske stimuluse, što je od značaja za nastanak i razvoj ateroskleroze i drugih kardiovaskularnih poremećaja.

U delu rezultata koji se odnosi na više koncentracije PFOS-a, obogaćenje aktivnosti aril-sulfotransferaza (pri 10 i 100 μM PFOS-u) i procesa povezanih sa metabolizmom kateholamina (pri 100 μM PFOS-u) može ukazivati na promene u sposobnosti ćelija da regulišu biološki aktivne fenolne i kateholne molekule, kao i adaptaciju na povećano redoks opterećenje. Citosolne sulfotransferaze (SULT) su važni enzimi II faze biotransformacije koji katališu reakciju sulfatacije brojnih endogenih supstrata, uključujući kateholamine, steroidne i tireoidne hormone, ali i ksenobiotika, čime povećavaju njihovu rastvorljivost i olakšavaju eliminaciju iz organizma (Gamage i sar., 2006). Zbog toga imaju značajnu ulogu u detoksikaciji i regulaciji metabolizma organskih molekula nakon izlaganja hemijskim stresorima (Xie i Xie, 2020). Iako se PFOS u ljudskom organizmu u velikoj meri ne metaboliše, postoje dokazi da PFAS mogu da utiču na aktivnost pojedinih izoformi SULT, čime posredno utiču na metaboličke i signalne puteve u ćeliji (Liu i sar., 2023). U tom smislu, promene u ekspresiji enzima uključenih u sulfataciju i metabolizam kateholamina mogu predstavljati jedan od indirektnih mehanizama putem kojih PFOS utiče na redoks ravnotežu u endotelnim ćelijama i regulaciju vaskularnog tonusa. Ovakvo tumačenje dodatno je podržano nalazom da je pri najvišoj koncentraciji PFOS-a (100 μM) identifikovano značajno obogaćenje bioloških procesa povezanih sa metabolizmom alkohola, kateholamina, biogenih amina i fenolnih jedinjenja, što ukazuje na aktivaciju metaboličkih puteva uključenih u

detoksikaciju i razgradnju organskih molekula. Ukupno posmatrano, rezultati sugerišu da niže koncentracije PFOS-a primarno utiču na signalne i regulatorne funkcije ćelije, uključujući imunsku signalizaciju, signalizaciju zavisnu od Ca^{2+} i međućelijsku adheziju, dok više koncentracije dovode do izraženije aktivacije metaboličkih procesa i procesa povezanih sa detoksikacijom, što verovatno predstavlja adaptivni odgovor ćelija na povećano hemijsko opterećenje. Zbirno, ovi nalazi ukazuju na kompleksan i nelinearan odgovor endotelnih ćelija na PFOS u zavisnosti od nivoa izloženosti.

Poređenje dobijenih nalaza sa dostupnim podacima o vaskularnim efektima PFOS-a ukazuje da transkriptomski odgovor EA.hy926 ćelija u ovom istraživanju može predstavljati ranu fazu endotelne deregulacije, koja ne mora nužno da se manifestuje kao akutna toksičnost i disfunkcija. U prilog značaju transkriptomskog pristupa govore i rezultati iz studije koja je analizirala globalni transkriptom endotelnih ćelija izolovanih iz uterine arterije trudnica nakon izlaganja PFOS-u, pri čemu su identifikovane promene u signalnim putevima koje se preklapaju sa vaskularnom disfunkcijom (npr. inflamacija, redoks signalizacija, promene vaskularnog tonusa). Ovi nalazi podržavaju koncept da PFOS može da „reprogramira“ endotelne ćelije na nivou ekspresije gena pre pojave očiglednih fenotipskih promena (Mishra i Kumar, 2023).

Širi toksikogenomski kontekst pokazuje da PFOS u različitim tipovima ćelija može aktivirati različite dominantne mehanizme delovanja. Na modelima hepatocita, uključujući kontinuiranu liniju humanog hepatoblastoma HepG2 i 3D sisteme primarnih humanih hepatocita (sferoida), PFOS i srodne PFAS supstance često indukuju transkriptomske promene povezane sa metabolizmom lipida, funkcijom peroksizoma, stresnim odgovorima i regulacijom metabolizma ksenobiotika, što je u skladu sa centralnom ulogom jetre u sistemskoj homeostazi i sa poznatim efektima PFAS u jetri koji su često povezani sa aktivacijom signalnih puteva posredovanih PPAR (Rowan-Carroll i sar., 2021). Nasuprot tome, u endotelu, čija je primarna uloga barijerna i signalna, dominantni transkriptomski odgovor usmeren je ka procesima kao što su ćelijska adhezija, reorganizacija citoskeleta, imunomodulacija i signalni putevi povezani sa NO-om i redoks ravnotežom. Ovi nalazi naglašavaju značaj poređenja različitih ćelijskih modela, jer isti hemijski agens može izazvati slične opšte obrasce odgovora (npr. stres i inflamaciju), ali kroz različite funkcionalne module koji su specifični za određeni tip tkiva.

Jedna od glavnih prednosti eksperimentalnog pristupa primenjenog u ovom istraživanju jeste to što omogućava praćenje ranih transkriptomskih odgovora humanih

endotelnih ćelija na PFOS u strogo kontrolisanim uslovima *in vitro*, o čemu je već bilo reči (videti potpoglavlje 6.1.1). Izbor EA.hy926 ćelija kao modela humanog makrovaskularnog endotela omogućio je dobru reproduktivnost, stabilnost kulture i dovoljno robustan biološki signal za globalnu analizu ekspresije gena. Takođe, izlaganje tokom 48 h predstavlja kompromis između veoma ranih signalnih događaja i kasnih sekundarnih posledica izlaganja. Drugim rečima, ovaj vremenski okvir je dovoljno dug da se inicijalni molekulski poremećaji prevedu u merljive promene ekspresije gena, ali i dovoljno kratak da se izbegne citotoksičnost, sekundarna apoptoza/nekroza ili izražene adaptivne promene koje otežavaju interpretaciju primarnog mehanizma delovanja. Slično tome, gradijent koncentracija PFOS-a (1, 10 i 100 μM) korišćen u ovom istraživanju omogućava poređenje niskog, srednjeg i visokog intenziteta hemijskog stresa u istom eksperimentalnom okviru i pruža uvid ne samo u jačinu, već i u kvalitet transkriptomskog odgovora, uključujući mogućnost detekcije koncentraciono-zavisnih i nelinearnih obrazaca. Istovremeno, ovaj pristup ima i važna ograničenja koja treba jasno uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata. Mikromolarne koncentracije PFOS-a i 48-časovno izlaganje ne odražavaju realne uslove izloženosti prosečnog čoveka, o čemu je već bilo reči (videti potpoglavlje 6.1.1). Zbog toga dobijene rezultate pre svega treba posmatrati kao mehanističku mapu ranih molekulskih događaja, a ne kao direktan model tipične populacione izloženosti. U tom smislu, najveća vrednost ovakvog eksperimentalnog dizajna jeste u identifikaciji ranih transkriptomskih promena koje mogu prethoditi merljivom fenotipu, dok bi logičan nastavak istraživanja podrazumevao dugotrajnije izlaganje nižim, nanomolarnim koncentracijama PFOS-a, kako bi se ispitalo da li se rani molekulski odgovor vremenom prevodi u trajnu promenu endotelne funkcije.

6.2. Efekti kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini u EA.hy926 ćelijama

Epidemiološke studije su pokazale pozitivnu korelaciju između izloženosti PFOA-i i povećanog rizika od hipertenzije, dislipidemije i drugih vaskularnih poremećaja (Xiao i sar., 2023; Hussey i sar., 2025), ali mehanizmi njihovog nastanka još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Uzimajući to u obzir, u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivan je uticaj kratkotrajnog izlaganja 1, 10 i 100 μM PFOA-i na EA.hy926 ćelije, pri čemu je dobijen značajan uvid u efekte koje ova supstanca izaziva na nivou funkcijskih i transkriptomskih odgovora u makrovaskularnim endotelnim ćelijama čoveka.

6.2.1. Funkcijski odgovori EA.hy926 ćelija nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini

Vijabilnost EA.hy926 ćelija nakon kratkotrajnog izlaganja 1, 10 i 100 μM PFOA-i praćena je primenom testa sa bojom alamarBlue™, kao osetljivog indikatora metaboličke aktivnosti ćelija. Nakon 24 i 48 h izlaganja nisu zabeležene statistički značajne promene u vijabilnosti ćelija u odnosu na kontrolu, što ukazuje da u ispitivanom koncentracijskom opsegu PFOA ne ispoljava izražen citotoksičan efekat. Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima na različitim ćelijskim modelima, uključujući endotelne ćelije krvnih sudova mozga govečeta (Gonella i sar., 2025), humane trofoblaste (Poteser i sar., 2020) i HUVEC (Miao i sar., 2025), gde je pokazano da PFOA ne utiče značajno na vijabilnost pri koncentracijama do 100 μM, dok se izraženiji citotoksični efekti javljaju tek pri višim koncentracijama, iznad 300 μM. Rezultati dobijeni testom sa bojom alamarBlue™ dodatno su potvrđeni analizom apoptoze i nekroze metodom dvostrukog bojenja aneksinom V-FITC/PI-om na protočnom citometru. U ispitivanom opsegu koncentracija nije uočeno povećanje udela apoptotičnih ili nekrotičnih ćelija, što ukazuje na odsustvo eksternalizacije PS-a i očuvan integritet ćelijske membrane. Ovi nalazi sugerišu da PFOA u navedenim uslovima ne aktivira apoptotske signalne puteve niti izaziva direktna oštećenja endotelnih ćelija. Slični rezultati su zabeleženi i u ranijim studijama, gde koncentracije PFOA-e do 100 μM tokom 48 h izlaganja nisu dovele do aktivacije kaspaza 3 i 7 niti do indukcije apoptoze (Pierozan i sar., 2020; Gonella i sar., 2025). Slično tome, analiza ćelijskog ciklusa nije pokazala promene u distribuciji ćelija po fazama, što dodatno potvrđuje odsustvo citotoksičnog efekta i ukazuje da kratkotrajno izlaganje PFOA-i ne aktivira kontrolne tačke ćelijskog ciklusa (engl. *checkpoints*). Iako pojedine studije ukazuju na potencijalne efekte PFOA-e na proliferaciju i dinamiku ćelijskog ciklusa, ovi efekti su uglavnom opisani u drugim ćelijskim modelima i pri različitim uslovima izlaganja (Pierozan i sar., 2018; Zhang i sar., 2019; Kabakci i sar., 2023). Tako su Kabakci i saradnici pokazali da izlaganje primarnih granuloza ćelija govečeta 4 i 40 μM PFOA-i u trajanju od 48 i 96 h ne menja procenat ćelija u svakoj od faza ćelijskog ciklusa (G0/G1, S, G2/M) u odnosu na kontrolu (Kabakci i sar., 2023), dok su Pierozan i saradnici detektovali povećanu proliferaciju epitelnih ćelija dojke nakon izlaganja 100 μM PFOA-i u trajanju od 24, 48 i 72 h koja je bila praćena značajno smanjenim udelom ćelija u fazi G0/G1 i povećanim udelom ćelija u fazi S ćelijskog ciklusa (Pierozan i sar., 2018). S druge strane, Zhang i saradnici su pokazali da

izlaganje ćelija embrionalnog rabdomiosarkoma čoveka 50 μM PFOA-i u trajanju od 72 h smanjuje procenat ćelija u fazi S ćelijskog ciklusa, uz istovremeno povećanu procentualnu zastupljenost ćelija u fazi G2/M (Zhang i sar., 2019). Ove razlike naglašavaju značaj ćelijskog modela, koncentracije i trajanja izlaganja u interpretaciji efekata PFOA-e.

Treba istaći da studije koje ispituju efekte PFOA-e na EA.hy926 ćelije gotovo u potpunosti nedostaju, što otežava direktno poređenje dobijenih rezultata sa literaturom. Delimično poređenje moguće je sa studijama koje su ispitivale efekte drugih PFAS jedinjenja na endotelne ćelije. Tako je pokazano da kratkotrajno izlaganje endotelnih ćelija retine čoveka nižim mikromolarnim koncentracijama (1 i 5 μM) perfluoroheksadekanske kiseline u uslovima *in vitro* ne dovodi do citotoksičnosti (Liu i sar., 2018), iako se ovi rezultati ne mogu direktno generalizovati zbog razlika u hemijskoj strukturi, koncentracijama i eksperimentalnim uslovima.

Dodatni faktor koji može uticati na procenu citotoksičnosti PFOA-e jeste sastav medijuma za gajenje ćelija. Naime, pokazano je da prisustvo FBS-a može značajno smanjiti citotoksičnost PFOA-e usled vezivanja za proteinske komponente seruma i smanjenja njegove bioraspoloživosti (Yang i sar., 2023). Stoga je, pored koncentracije i trajanja izlaganja, neophodno uzeti u obzir i eksperimentalne uslove prilikom interpretacije dobijenih rezultata. Još jedno važno razmatranje koje treba uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata je podatak da u poređenju sa PFOS-om, PFOA generalno ispoljava slabiji citotoksični potencijal, što se delimično može objasniti razlikama u funkcionalnim grupama i fizičko-hemijskim osobinama ovih strukturno srodnih jedinjenja (Kleszczyński i sar., 2007). Ukupno posmatrano, dobijeni rezultati ukazuju da EA.hy926 ćelije, u eksperimentalnim uslovima korišćenim u ovoj tezi, pokazuju relativnu otpornost na kratkotrajno izlaganje mikromolarnim koncentracijama PFOA-e, bez značajnih promena u vijabilnosti, indukciji ćelijske smrti ili ćelijskom ciklusu. Ovi nalazi sugerišu da akutno izlaganje PFOA-i u ispitivanom opsegu koncentracija ne narušava osnovne parametre ćelijske homeostaze, ali ne isključuju mogućnost pojave suptilnijih ili kumulativnih efekata pri dugotrajnoj izloženosti ili u uslovima *in vivo*.

U narednom koraku ispitivan je efekat izlaganja mikromolarnim koncentracijama PFOA-e na migraciju, adheziju i angiogeni potencijal EA.hy926 ćelija. Dobijeni rezultati pokazali su da kratkotrajno izlaganje PFOA-i u ispitivanom koncentracijskom opsegu ne dovodi do značajnih promena u ovim ključnim funkcijskim karakteristikama endotelnih ćelija, koje su od presudnog značaja za održavanje vaskularne homeostaze. Migracija i

angiogeneza predstavljaju kompleksne i visoko regulisane procese koji zavise od koordinisane aktivnosti signalnih puteva posredovanih VEGF-A i VEGFR-2, koji kontrolišu proliferaciju i migraciju endotelnih ćelija, kao i od adhezivnih molekula poput PECAM-1 i VE-kadherina, koji stabilišu međućelijske kontakte i održavaju integritet i permeabilnost krvnih sudova (Ferrara, 2004; Dorland i Huveneers, 2017; Lee i sar., 2021). U tom kontekstu, odsustvo promena u ekspresiji ovih ključnih regulatora, zajedno sa očuvanim angiogenim potencijalom, ukazuje da PFOA, u odabranim koncentracijama i vremenskom okviru izlaganja, ne indukuje poremećaje vaskularnog remodelovanja niti disfunkciju endotela. Međutim, poređenje sa rezultatima dobijenim nakon dugotrajnog izlaganja (6 i 12 nedelja) EA.hy926 ćelija nanomolarnim koncentracijama PFOA-e (1–100 nM) ukazuje na značajno drugačiji obrazac odgovora. Naime, pokazano je da produženo izlaganje dovodi do promena u procesima povezanim sa angiogenezom, uključujući povećanu migraciju nakon 6 nedelja i promene u formiranju endotelnih tubula nakon 12 nedelja izlaganja, što ukazuje na vremenski zavisnu modulaciju angiogenog odgovora (Opacic i sar., 2025). Ovi nalazi sugerišu da, za razliku od akutnog izlaganja, hronična izloženost niskim koncentracijama PFOA-e može dovesti do funkcionalne reorganizacije endotela, čak i u odsustvu izraženih citotoksičnih efekata. U svetlu ovih rezultata, jasno je da odsustvo promena nakon 48-časovnog izlaganja ne isključuje mogućnost nastanka biološki relevantnih efekata tokom dugotrajnog izlaganja. Naprotiv, razlike između kratkotrajnog i dugotrajnog izlaganja sugerišu da se efekti PFOA-e razvijaju postepeno i da uključuju suptilne, ali kumulativne promene u endotelnim ćelijama. Iako dosadašnje studije ukazuju da PFOA može uticati na migraciju i angiogenezu u različitim ćelijskim modelima (Poteser i sar., 2020; Miao i sar., 2025), ovi efekti su izrazito zavisni od tipa ćelija, koncentracije i trajanja izlaganja. Poseban doprinos ovog istraživanja ogleda se u činjenici da su prvi put sistematski analizirani efekti PFOA-e na makrovaskularne endotelne ćelije čoveka, uključujući i adheziju za proteine ECM-a, za koju do sada nisu postojali dostupni podaci. S obzirom na to, rezultati ove studije doprinose boljem razumevanju efekata PFOA-e na funkcijski integritet endotela i ukazuju da kratkotrajno izlaganje mikromolarnim koncentracijama ove supstance nije dovoljno da naruši osnovne procese povezane sa migracijom i angiogenezom. S druge strane, dostupni literaturni podaci ukazuju na to da dugotrajno izlaganje nanomolarnim koncentracijama PFOA-e, koje su bliže realnim uslovima izloženosti, može dovesti do funkcijskih promena endotela, što naglašava značaj primene dugotrajnog izlaganja ćelija u uslovima *in vitro* u proceni rizika.

U saglasnosti sa prethodno dobijenim rezultatima, analiza inflamacijskog odgovora EA.hy926 ćelija nakon 48-časovnog izlaganja mikromolarnim koncentracijama PFOA-e ukazala je na izostanak povećanog vezivanja monocita za endotelni monosloj, kao i na odsustvo promena u ekspresiji adhezivnih molekula ICAM-1, VCAM-1 i E-selektina. Ovi molekuli predstavljaju ključne medijatore ranih faza inflamacijskog odgovora, s obzirom da omogućavaju adheziju i transmigraciju leukocita kroz vaskularni zid, te se njihova povećana ekspresija smatra jednim od ranih markera aktivacije i disfunkcije endotela (Ley i sar., 2007; Pober i Sessa, 2007). Izostanak promena u njihovoj ekspresiji i funkcionalnom vezivanju monocita sugeriše da kratkotrajno izlaganje PFOA-i u ispitivanom koncentracijskom opsegu nije dovoljno da indukuje inflamacijski odgovor endotela. Međutim, rezultati dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija nanomolarnim koncentracijama PFOA-e tokom 6 i 12 nedelja ukazuju na značajno drugačiji obrazac ćelijskog odgovora u odnosu na kratkotrajni tretman. Naime, pokazano je da produženo izlaganje ćelija PFOA-i dovodi do povećane adhezije monocita već nakon 6 nedelja, kao i do daljeg porasta ovog efekta nakon 12 nedelja, što ukazuje na postepenu aktivaciju inflamacijskog fenotipa endotela usled hronične izloženosti (Opacic i sar., 2025). Ovi nalazi jasno ukazuju da je vreme izlaganja ključna odrednica inflamacijskog odgovora endotelnih ćelija, pri čemu kratkotrajni tretmani ne odražavaju u potpunosti biološke efekte koji se razvijaju tokom dugotrajne, realističnije izloženosti niskim koncentracijama. Slično tome, analiza integriteta endotelne barijere u ovom istraživanju pokazala je da 48-časovno izlaganje mikromolarnim koncentracijama PFOA-e ne dovodi do promena u propustljivosti monosloja endotelnih ćelija niti u ekspresiji ZO-1 i okludina, koji imaju ključnu ulogu u održavanju barijerne funkcije i regulaciji paracelularnog transporta (Dejana i sar., 2008). Očuvana ekspresija ovih proteina ukazuje da akutno izlaganje PFOA-i u opsegu od 1–100 μM ne narušava strukturnu organizaciju TJ. Nasuprot tome, u modelu dugotrajnog izlaganja pokazano je značajno povećanje endotelne permeabilnosti nakon 12 nedelja izlaganja EA.hy926 ćelija nanomolarnim koncentracijama PFOA-e (Opacic i sar., 2025), što dodatno potvrđuje da hronična izloženost, čak i pri znatno nižim koncentracijama, može dovesti do narušavanja funkcije endotelne barijere. Ukupno posmatrano, ovi rezultati ukazuju na fundamentalnu razliku između akutnog i hroničnog izlaganja PFOA-i: dok kratkotrajno izlaganje visokim, mikromolarnim koncentracijama ne dovodi do merljivih promena u inflamacijskom odgovoru i integritetu endotela, dugotrajna izloženost niskim, fiziološki relevantnim koncentracijama u nanomolarnom opsegu indukuje proinflamacijski fenotip i povećanu propustljivost. Ovakav obrazac dodatno ističe značaj primene modela dugotrajnog *in vitro* izlaganja u proceni rizika, jer oni vernije odražavaju

realne scenarije izloženosti i omogućavaju detekciju suptilnih, ali biološki relevantnih promena u funkciji endotela.

S obzirom na centralnu ulogu oksidativnog stresa u razvoju endotelne disfunkcije, u ovom istraživanju analizirani su i ključni parametri redoks ravnoteže. Dobijeni rezultati pokazali su da kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija mikromolarnim koncentracijama PFOA-e ne dovodi do promena u intracelularnom nivou ROS-a, niti utiče na stvaranje NO-a. U skladu sa tim, nije uočena promena u ekspresiji gena za eNOS, niti u fosforilaciji eNOS-a nakon 15, 30 i 60 minuta izlaganja. Enzimska aktivnost eNOS-a i posledično stvaranje NO-a predstavljaju ključne regulatorne mehanizme vaskularnog tonusa, inhibicije agregacije trombocita i održavanja antiinflamacijskog fenotipa endotela (Förstermann i Sessa, 2012). Očuvana funkcija signalnog puta eNOS–NO u ovom istraživanju ukazuje da akutna izloženost PFOA-i, u ispitivanom koncentracijskom opsegu, ne narušava osnovne regulatorne mehanizme endotelne homeostaze. Ovi nalazi su delimično u saglasnosti sa pojedinim studijama koje ukazuju da PFAS ne moraju nužno indukovati oksidativni stres u svim eksperimentalnim uslovima, već da efekat zavisi od koncentracije, trajanja izlaganja i tipa ćelijskog modela. Na primer, pokazano je da PFOA u nekim ćelijskim linijama ne dovodi do značajnog porasta ROS-a pri nižim koncentracijama i kratkotrajnom izlaganju, dok se izraženiji prooksidativni efekti javljaju tek pri višim koncentracijama ili nakon produženog izlaganja. Nasuprot tome, za srodna PFAS jedinjenja, uključujući PFOS, u endotelnim ćelijama je opisan porast ROS-a, narušavanje citoskeleta i smanjena bioraspoloživost NO-a (Qian i sar., 2010; Pierozan i sar., 2020), što ukazuje da i male razlike u hemijskoj strukturi mogu dovesti do različitih bioloških efekata. Dalje, rezultati dobijeni u ovom istraživanju su u skladu sa nalazima nakon dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija nanomolarnim koncentracijama PFOA-e, gde takođe nisu uočene izražene promene u osnovnim parametrima redoks ravnoteže, iako su detektovane suptilne transkriptomske i funkcionalne promene u drugim procesima (Opacic i sar., 2025). Ovakva razlika između odsustva promena na nivou ROS-a/NO-a i prisustva promena na nivou ekspresije gena ukazuje da transkriptomski odgovor može predstavljati rani indikator adaptacije ćelija, koji prethodi merljivim funkcijskim poremećajima. Pri interpretaciji dobijenih rezultata u ovoj studiji treba dodatno uzeti u obzir da je redoks status endotela rezultat dinamičke ravnoteže između stvaranja ROS-a i kapaciteta antioksidativnih sistema. Moguće je da kratkotrajno izlaganje PFOA-i aktivira kompenzatorne mehanizme, poput signalnih puteva zavisnih od transkripcionog faktora 2 povezanog sa nuklearnim faktorom eritroidom 2 (Nrf2), čime se

održava stabilan nivo ROS-a i sprečava narušavanje funkcije eNOS-a (Ma, 2013). Takođe, odsustvo promena u NO-u može ukazivati da u datim uslovima nije došlo do aktivacije ključnih izvora oksidativnog stresa, poput NADPH oksidaza, mitohondrija ili rasprezanja eNOS-a, koji su često uključeni u patogenezu endotelne disfunkcije.

6.2.2. Transkriptomski odgovori EA.hy926 ćelija nakon kratkotrajnog izlaganja perfluorooktanskoj kiselini

Analizom transkriptoma identifikovani su DEG-ovi nakon 48 h izlaganja odabranim koncentracijama PFOA-e (1, 10 i 100 μM). Zapaženo je da sve tri ispitivane koncentracije dovode do promena u ekspresiji gena, ali u različitom obimu. Uočen je jasan trend porasta ukupnog broja DEG-ova sa povećanjem koncentracije PFOA-e: 98 pri 1 μM, 197 pri 10 μM i 359 pri 100 μM, uz dominaciju gena sa smanjenom ekspresijom pri najvišoj koncentraciji. Ovakav obrazac je u skladu sa klasičnim dozno-zavisnim transkriptomskim odgovorom, gde više koncentracije ksenobiotika aktiviraju širi spektar signalnih puteva i regulatornih mreža kao posledica izloženosti hemijskom stresu. Ova zapažanja su u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima koja ukazuju na dozno-zavisan efekat PFOA-e kako u *in vivo* modelima, gde je zabeležen porast broja DEG-ova u jetri miševa sa povećanjem doze (Attema i sar., 2022), tako i u *in vitro* sistemima, gde su HepaRG ćelije pokazale značajno veći broj DEG-ova nakon izlaganja 100 μM u odnosu na 10 μM PFOA-u (Murase i sar., 2023). Iako se ovi rezultati razlikuju od prethodno opisanih obrazaca za PFOS, takve razlike su očekivane, imajući u vidu da različita PFAS jedinjenja pokazuju specifične transkriptomske profile. Razlike u funkcionalnoj grupi, sulfonska kod PFOS-a i karboksilna kod PFOA-e, utiču na farmakokinetiku, intracelularnu distribuciju i interakcije sa ciljanim molekulima, što se odražava i na obrazac genske ekspresije (Rowan-Carroll i sar., 2021). Istovremeno, važno je naglasiti da se transkriptomske promene često javljaju pre pojave izraženih fenotipskih ishoda, kao što su citotoksičnost ili pojava apoptoze/nekroze, te mogu predstavljati rane signale adaptacije ili početne faze disfunkcije endotela. Ovakvo tumačenje podržavaju studije koje integrišu apikalne i transkriptomske krajnje ishode u proceni efekata PFAS. Na primer, TempO-Seq analiza u kombinaciji sa funkcionalnim ishodima pokazala je da transkriptomski BMC može detektovati biološki odgovor pri nižim koncentracijama PFAS u odnosu na apikalne krajnje tačke (Rowan-Carroll i sar., 2021), dok je *in vitro* pristup u kombinaciji sa PBTK korišćen za povezivanje transkriptomskih promena sa funkcionalnim efektima u hepatocitima i drugim ćelijskim modelima (Fragki i sar., 2023). Dodatnu potvrdu

visoke osetljivosti transkriptomskog pristupa pružaju i rezultati studije Opacic i saradnika (2025), u kojoj je direktno upoređena osetljivost apikalnih i transkriptomskih krajnjih ishoda nakon dugotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija nanomolarnim koncentracijama PFOA-e, koje su u opsegu realne ljudske izloženosti. Pokazano je da transkriptomski odgovori predstavljaju osetljivije indikatore ranih bioloških promena u odnosu na apikalne parametre, što se ogleda u nižim vrednostima HED-ova izvedenim iz donjih percentila distribucije gena u poređenju sa vrednostima HED-ova zasnovanim na funkcionalnim ishodima. Ovakav odnos ukazuje da promene na nivou ekspresije gena prethode merljivim poremećajima funkcije i predstavljaju osetljiviji indikator biološkog odgovora. U tom kontekstu, transkriptomski pristup omogućava detekciju suptilnih i ranih efekata koji mogu ostati neprimećeni pri analizi apikalnih krajnjih tačaka, naročito u uslovima niskih nivoa izloženosti. Zbirno, ovi nalazi potvrđuju da integracija transkriptomskih podataka u procenu rizika značajno povećava osetljivost detekcije bioloških efekata u odnosu na tradicionalne apikalne pristupe.

Analiza Venovim dijagramom ukazala je na postojanje relativno malog broja zajedničkih DEG-ova između svih ispitivanih koncentracija, što sugeriše postojanje ograničenog konzerviranog odgovora, ali i velikog broja jedinstvenih gena, naročito pri 100 μM PFOA-i, što odražava koncentraciono-specifičan odgovor. Ovakva struktura DEG-ova, sa jasno definisanim zajedničkim jezgrom i koncentraciono-specifičnim komponentama, je uobičajena u toksikogenomskim studijama, gde deo odgovora odražava opšti stres ili adaptaciju, dok drugi deo ukazuje na aktivaciju specifičnih signalnih puteva koji postaju dominantni tek iznad određenog praga izloženosti. Posmatrano po koncentracijama, pri izlaganju 1 μM PFOA-i uočene su relativno blage promene u ekspresiji gena i ograničeno funkcionalno obogaćenje, što može ukazivati na početni adaptivni odgovor ćelija. Pri 10 μM PFOA-i detektovan je umeren broj DEG-ova i jasnije razdvajanje u odnosu na kontrolu, što ukazuje na proširenje transkriptomskog odgovora. Nasuprot tome, pri 100 μM PFOA-i zabeležene su najizraženije promene, uključujući najveći broj DEG-ova i najširi spektar obogaćenih bioloških procesa, što je u skladu sa scenarijem intenzivnog ćelijskog stresa i aktivacije više regulatornih mreža.

U narednom koraku su DEG-ovi korišćeni za integraciju sa biološkim procesima i molekulskim funkcijama. Ova analiza dodatno je potvrdila koordinisan i koncentraciono-zavisan odgovor EA.hy926 ćelija nakon kratkotrajnog izlaganja mikromolarnim koncentracijama PFOA-e. Pri najnižoj koncentraciji PFOA-e (1 μM), efekti su prvenstveno

usmereni na organizaciju hromatina i interakcije sa DNK, što ukazuje na rane, verovatno adaptivne epigenetičke promene bez značajnog narušavanja ćelijske homeostaze. Nasuprot tome, pri najvišoj koncentraciji PFOA-e (100 μM) uočen je širok i kompleksan molekulski odgovor, koji uključuje aktivaciju velikog broja gena uključenih u regulaciju transkripcije, vezivanje za DNK i funkciju transkripcionih faktora. Ovakav odgovor praćen je promenama vezanim za ECM, lipidni metabolizam i signalne puteve, što ukazuje na poremećaj ćelijske homeostaze i međućelijske komunikacije. Dobijeni rezultati ukazuju da PFOA pri višoj koncentraciji indukuje koordinisan i široko rasprostranjen transkriptomski odgovor u EA.hy926 ćelijama, koji zahvata regulatorne elemente DNK, transkripcione faktore i hromatinsku arhitekturu, dok su efekti pri nižoj koncentraciji ograničeni, pre svega, na strukturne aspekte hromatina.

Među genima sa najizraženijim relativnim promenama u ekspresiji u odnosu na kontrolu dosledno se izdvaja fuzioni transkript *EFNA4–EFNA3* sa snažnim porastom ekspresije koji kulminira pri 100 μM PFOA-i, kao i *ATP5MF-PTCD1*. Posebno je interesantan gen *EFNA4* (kodira protein efrin-A4) koji je važan regulator endotelne biologije: ima ulogu u kontaktima i signalizaciji između ćelija, migraciji, reorganizaciji citoskeleta, vaskularnom remodelovanju i angiogenezi (Kania i Klein, 2016; Vreeken i sar., 2020). S obzirom na to da su efrini tesno povezani sa razvojnim i morfogenetskim programima u vaskulaturi, njihova aktivacija na nivou gena može delimično objasniti i uočeno obogaćenje GO procesa pri izlaganju ćelija 100 μM PFOA-i. Naime, nije neočekivano što se pri najvišoj koncentraciji PFOA-e javlja obogaćenje procesa koji se u GO anotaciji opisuju kao razvojni i morfogenetski, jer oni u endotelnom kontekstu često predstavljaju genske programe povezane sa angiogenezom i remodelovanjem vaskulature. Gen *ATP5MF-PTCD1*, koji pokazuje izražen i koncentraciono-zavisan porast ekspresije, funkcionalno je povezan sa bioenergetikom mitohondrija i regulacijom ekspresije mitohondrijskih transkripata. PTCD1 učestvuje u obradi i stabilnosti mitohondrijske RNK, čime direktno utiče na efikasnost oksidativne fosforilacije i energetsku homeostazu ćelije (Rackham i sar., 2009). Promene u njegovoj ekspresiji mogu ukazivati na adaptivni odgovor mitohondrija na hemijski stres, što je u skladu sa nalazima koji povezuju izlaganje PFAS sa disfunkcijom mitohondrija i poremećajem energetskog metabolizma (Hofmann i sar., 2023; Happel i sar., 2025). Ovakve promene mogu biti povezane i sa identifikovanim molekulskim funkcijama obogaćenim u ovom istraživanju, naročito onima koje se odnose na enzimsku aktivnost i metabolizam lipida, što dodatno ukazuje na reorganizaciju metaboličkih puteva

pri višim koncentracijama PFOA-e. Značajno povećana ekspresija fuzionog transkripta *BIVM-ERCC5* može ukazivati na aktivaciju mehanizama odgovora na oštećenje DNK i ćelijski stres. ERCC5 (takođe poznat kao XPG) predstavlja ključnu endonukleazu odgovornu za uklanjanje oštećenja na DNK izazvanih različitim genotoksičnim agensima (Nouspikel, 2009). Povećana ekspresija ovog gena sugeriše da izlaganje PFOA-i može pokrenuti mehanizme održavanja genomske stabilnosti, iako je izraženi citotoksični efekat izostao. Dalje, povećana ekspresija gena poput *ZNF559-ZNF177*, koji pripadaju porodici cink-prst proteina (engl. *zinc-finger*), ukazuje na pojačanu aktivnost transkripcionih regulatora i proteina koji se vezuju za DNK. Proteini ove porodice imaju ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena, organizaciji hromatina i odgovoru na ćelijski stres (Cassandri i sar., 2017). Povećana ekspresija *ZNF559-ZNF177* je u skladu sa dominantnim molekulskim funkcijama identifikovanim pri najvišoj koncentraciji PFOA-e (100 μM), koje uključuju vezivanje za DNK i regulaciju transkripcije, što ukazuje na globalnu reorganizaciju transkripcionih mreža kao deo adaptivnog odgovora ćelije na hemijsko opterećenje.

Analiza gena sa najizraženijim smanjenjem relativne ekspresije dodatno je potvrdila postojanje koncentraciono-zavisnog, ali i funkcionalno konzistentnog odgovora ćelija na izlaganje PFOA-i. Već pri najnižoj koncentraciji PFOA-e (1 μM), uočeno je izraženo smanjenje ekspresije gena *GALNT4*, koji kodira enzim polipeptid N-acetilgalaktozaminiltransferazu-4 uključen u proces O-glikozilacije proteina. O-glikozilacija predstavlja važan posttranslacioni mehanizam koji utiče na stabilnost, lokalizaciju i funkciju membranskih proteina, uključujući CAM-ove (Bennett i sar., 2012). S obzirom na to da glikozilacija može menjati interakcije između endotela i monocita, promene u ekspresiji *GALNT4* potencijalno mogu uticati na adheziju monocita i TEM. U skladu s tim, eksperimentalni modeli vaskularne inflamacije ukazuju da poremećaji O-glikozilacije doprinose regulaciji adhezivnih interakcija i razvoju ateroskleroze (Schjoldager i Clausen, 2012). Do sličnih zapažanja su došli i Ye i saradnici (2022), kada su na modelu ateroskleroze pokazali da glikozilacija zavisna od GALNT4 utiče na adheziju monocita za endotel i njihovu transendotelnu migraciju, što ukazuje da promene u ekspresiji GALNT4 mogu biti od značaja za vaskularnu inflamaciju. Ipak, potreban je oprez u interpretaciji ovih rezultata, s obzirom da pravac i funkcionalni ishod (npr. adhezija monocita za endotelne ćelije, barijerna funkcija endotela) ne moraju direktno pratiti promene u ekspresiji gena, već zavise od nivoa proteina, posttranslacionih modifikacija i specifičnih uslova mikrookruženja. Dalje, gen *TP53TG3C* pokazuje koncentraciono-zavisno smanjenje ekspresije, što može ukazivati

na modulaciju signalnog puta povezanog sa tumor supresorom p53. Ovaj protein ima ključnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, odgovora na oštećenje DNK i indukciji apoptoze (Levine, 2020). Smanjena ekspresija transkripata povezanih sa p53 može ukazivati na kompromitovan ćelijski odgovor na stres, što potencijalno doprinosi smanjenoj sposobnosti endotela da adekvatno odgovori na oštećenja izazvana PFOA-om. Pri srednjoj koncentraciji (10 μM), pored *TP53TG3C*, izraženo je i smanjenje ekspresije gena *GOLGA8K*, koji pripada porodici golgina i povezan je sa funkcijom Goldžijevog aparata, uključujući održavanje njegove strukture i intracelularni transport proteina (Wong i Munro, 2014). Poremećaji u funkciji Goldžijevog aparata mogu uticati na sekreciju i pravilnu lokalizaciju proteina, što ima šire implikacije na ćelijsku homeostazu i signalizaciju. Pri najvišoj koncentraciji PFOA-e (100 μM) dodatno dolazi do smanjenja ekspresije gena uključenih u ćelijsku adheziju i organizaciju tkiva, poput *PCDHGA12*, člana porodice protokadherina. Protokadherini imaju važnu ulogu u međućelijskoj komunikaciji i stabilizaciji ćelijskih kontakata (Hulpiau i van Roy, 2009). Njihova smanjena ekspresija može doprineti narušavanju međućelijskih veza i funkcionalnog integriteta endotelnog monosloja.

Funkcionalno obogaćenje pri 1 μM PFOA-i je relativno usko: molekulske funkcije su vezane za nukleozomsku DNK i strukturne komponente hromatina, dok biološki procesi obuhvataju formiranje/organizaciju nukleozoma i formiranje kompleksa protein–DNK. Ovakav profil je u skladu sa idejom da pri nižim koncentracijama PFOA-e dolazi do rane preraspodele regulatornih mehanizama na nivou hromatina (komponente histona, remodelovanje hromatina, pristupačnost DNK), što može predstavljati adaptaciju koja postavlja temelj za kasnije transkriptomske promene. U širem kontekstu, postoje podaci koji ukazuju da se PFAS, uključujući PFOS i PFOA-u, mogu dovesti u vezu sa epigenetskim promenama kao što su metilacija DNK, modifikacije histona i remodelovanje hromatina (Pierozan i Karlsson, 2020; Kim i sar., 2021).

Dodatno, iako ukupan broj DEG-ova raste sa porastom koncentracije PFOA-e, značajno funkcionalno obogaćenje u ovom skupu podataka detektovano je pri najnižoj (1 μM) i najvišoj koncentraciji (100 μM), ali ne i pri srednjoj koncentraciji (10 μM). Odsustvo statistički značajnih promena pri 10 μM može ukazivati na nelinearni odgovor ćelija na PFOA-u, koji je u određenoj meri konzistentan sa konceptom NMDR-a, ranije opisanim za PFOS (videti potpoglavlje 6.1). U literaturi su ovakvi obrasci, gde se efekti javljaju pri nižim i višim koncentracijama, ali izostaju pri srednjim, često opisani kao "kriva u obliku slova U" (engl. *U-shaped curve*) i mogu nastati kao posledica diferencijalne aktivacije signalnih

puteva, negativnih povratnih sprega, adaptivnih ćelijskih odgovora ili promena u dominantnim mehanizmima delovanja sa porastom koncentracije (Lagarde i sar., 2015). Međutim, rezultati dobijeni u ovom istraživanju ne ukazuju na klasičan NMDR na nivou ukupnog broja DEG-ova, već pre sugerišu postojanje „prelazne“ ili kompenzatorne zone pri srednjoj koncentraciji (10 μM), u kojoj dolazi do reorganizacije transkriptomskog odgovora bez jasnog funkcionalnog obogaćenja. Ovakav obrazac može odražavati ravnotežu između inicijalnih adaptivnih mehanizama aktiviranih pri nižim koncentracijama i izraženijeg stresnog odgovora koji se javlja pri višim koncentracijama. Dodatno, činjenica da je pri 10 μM PFOA-i detektovan relativno veliki broj DEG-ova, ali bez statistički značajnih obogaćenja molekulskih funkcija i bioloških procesa, najčešće znači da su DEG-ovi raspoređeni kroz različite funkcionalne kategorije, bez dovoljne akumulacije u pojedinačnim procesima da bi se dostigao prag statističke značajnosti (FDR). Važno je istaći i da analiza molekulskih funkcija i bioloških procesa zasnovana na listi DEG-ova zavisi od definisanog praga za identifikaciju DEG-ova. U situacijama kada postoji širok, ali relativno slab (plitak) transkriptomski odgovor, odnosno kada je prisutan veći broj gena sa umerenim promenama u ekspresiji, metode koje koriste rangirane liste svih gena (npr. GSEA) mogu biti osetljivije u detekciji biološki relevantnih promena u odnosu na pristupe zasnovane na fiksnim graničnim vrednostima (engl. *cut-off*). U tom smislu, odsustvo značajno obogaćenih molekulskih funkcija i bioloških procesa pri 10 μM PFOA-i ne znači da nema biološkog efekta, već da je efekat verovatno više difuzan ili raspoređen kroz veći broj slabije izraženih signalnih puteva. Uzimajući u obzir sve navedeno, važno je još jednom naglasiti da promene na nivou transkriptoma ne moraju nužno biti praćene merljivim funkcionalnim ishodima. Brojne studije su pokazale da transkriptomski odgovori mogu biti izraženi čak i u odsustvu značajnih promena u proliferaciji, apoptozi ili drugim apikalnim krajnjim tačkama (Leung i sar., 2020; Stanic i sar., 2023). U tom kontekstu, uočene promene u ekspresiji gena verovatno predstavljaju rane, adaptivne odgovore ćelija na izlaganje PFOA-i, koji prethode razvoju jasnih fenotipskih poremećaja i mogu imati značaj u inicijalnim fazama endotelne deregulacije.

Pri 100 μM PFOA-i uočeno je obogaćenje molekulskih funkcija dominantno vezanih za regulaciju transkripcije i interakcije sa DNK (vezivanje za *cis*-regulatorne regione, transkripcioni aktivatori/faktori, vezivanje za hromatin), što upućuje na širi pomak u transkripcionoj regulaciji. Ovakva slika je česta u uslovima izlaganja visokim koncentracijama ispitivane supstance, gde se aktiviraju stresni odgovori i veliki broj

regulatornih čvorišta. Pri izlaganju najvišoj koncentraciji PFOA-e uočeno je i obogaćenje strukturne komponente ekstracelularnog matriksa, što je posebno relevantno za endotel, jer ECM i interakcije između ćelija i ECM-a snažno utiču na barijernu funkciju, migraciju i angiogenezu. GO analiza je pokazala da su značajno obogaćeni biološki procesi u EA.hy926 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja 100 μM PFOA-i prevashodno razvojni i morfogenetski, s obzirom da obuhvataju razvoj sistema/tkiva/epitela, morfogenezu organa i morfogenezu razgranate strukture. U endotelnom kontekstu, ovakvi GO termini često predstavljaju skup gena koji kodiraju proteine koji učestvuju u angiogenezi, remodelovanju vaskulature i fenotipskim promenama endotelnih ćelija. U prilog tome govori i činjenica da je među genima sa najizraženijim relativnim promenama u ekspresiji u odnosu na kontrolu i *EFNA4–EFNA3*. Pored toga, sekvenciranje celokupnog transkriptoma u HUVEC nakon izlaganja PFOS-u takođe je ukazalo na promene u razvojnim i signalnim putevima kao što je Notch (Ashby i sar., 2024), što podržava ideju da PFAS mogu pomerati endotel ka programima remodelovanja i/ili promene fenotipa i na nivou ekspresije gena.

Per- i polifluoroalkilne suptance u različitim tipovima ćelija mogu aktivirati različite dominantne načine delovanja, što ukazuje na izraženu tkivnu specifičnost njihovih efekata. U modelima humanih hepatocita, PFOA i srodne PFAS često indukuju transkriptomske promene povezane sa metabolizmom lipida, funkcijom peroksizoma, stresnim odgovorima i regulacijom metabolizma ksenobiotika, što je u skladu sa centralnom ulogom jetre u sistemskoj homeostazi i sa efektima PFOA-e u jetri zavisnim od PPAR (Buhrke i sar., 2015). Posebno je pokazano da visoke koncentracije PFOA-e, poput onih korišćenih u ovom istraživanju, mogu aktivirati specifične metaboličke i odbrambene mehanizme u hepatocitima (Hu i Hu, 2009; Rowan-Carroll i sar., 2021; Ojo i sar., 2022). Nasuprot tome, u endotelu, gde dominiraju barijerna i signalna funkcija, transkriptomski odgovori češće pomeraju težište ka regulaciji međućelijskih kontakata, citoskeleta, ECM-a, imunološke signalizacije i angiogeneze (Vreeken i sar., 2020), što je u skladu sa obogaćenjima dobijenim u ovom istraživanju. Korisno je i poređenje sa studijom u kojoj je pokazano da izlaganje PFOA-i može biti praćeno promenama u ekspresiji gena povezanih sa morfogenezom i razvojem na sistemskom nivou (npr. transkriptomski odgovor krvi nakon izlaganja) (Cao i sar., 2023), što pokazuje da razvojni i morfogenetski termini identifikovani u GO analizi nisu neočekivani u kontekstu izlaganja PFOA-i, jer u endotelnim ćelijama često odražavaju aktivaciju programa povezanih sa angiogenezom i remodelovanjem vaskulature. Istovremeno, brojni literaturni podaci povezuju PFAS sa disfunkcijom endotela, uključujući

pojavu oksidativnog stresa, remodelovanje aktinskog citoskeleta, povećanje permeabilnosti i aktivaciju inflamacijskog fenotipa. U tom svetlu, nalaz da se pri 100 μM PFOA-i uočava obogaćenje procesa povezanih sa ECM-a i globalnom regulacijom transkripcije, a pri 1 μM promene na nivou hromatinske organizacije, može se tumačiti kao rana molekulska osnova koja, u zavisnosti od trajanja izlaganja, doze i mikrookruženja, može evoluirati ka poremećajima funkcije endotela, uključujući promene u barijernoj funkciji, migraciji i angiogenezi. Ovo tumačenje dodatno je potkrepljeno nalazima da dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija niskim, nanomolarnim koncentracijama PFOA-e dovodi do merljivih funkcijskih promena u uslovima bližim realnoj izloženosti prosečnog čoveka (Opacic i sar., 2025), što ukazuje da transkriptomske promene detektovane nakon kratkotrajnog izlaganja mogu predstavljati rane događaje u razvoju endotelne disfunkcije.

Slično kao i za PFOS, eksperimentalni pristup primenjen za PFOA-u ima niz važnih prednosti, ali i ograničenja koja treba uzeti u obzir pri interpretaciji dobijenih rezultata. Ključna prednost ogleda se u upotrebi EA.hy926 ćelija, humanog *in vitro* modela koji omogućava direktno ispitivanje efekata PFOA-e na endotel bez uticaja sistemskih i drugih faktora prisutnih u epidemiološkim studijama, kao i bez potrebe za ekstrapolacijom između bioloških vrsta. Izbor 48-časovnog izlaganja u mikromolarnom opsegu koncentracija (1–100 μM) omogućio je detekciju ranih transkriptomskih odgovora, pre pojave izraženih citotoksičnih i sekundarnih efekata. Ovakav dizajn je posebno pogodan za identifikaciju inicijalnih molekulskih mehanizama delovanja PFOA-e, jer obezbeđuje dovoljno snažan signal za globalnu analizu ekspresije gena, uz očuvanu vijabilnost i funkcionalni integritet ćelija. Gradijent koncentracija dodatno omogućava sagledavanje koncentraciono-zavisnih obrazaca odgovora i identifikaciju prelaza između adaptivnih i stresnih transkriptomskih odgovora. Međutim, ograničenja ovog pristupa su slična kao i kod PFOS-a, ali sa važnom razlikom u dostupnosti komplementarnih podataka o dugotrajnom izlaganju endotelnih ćelija PFOA-i. Mikromolarne koncentracije i kratkotrajno izlaganje ne odražavaju u potpunosti realne scenarije izloženosti, koji su u populaciji uglavnom hronični i u nanomolarnom opsegu. Zbog toga se rezultati dobijeni u ovom istraživanju prvenstveno mogu tumačiti kao mehanistički model ranih događaja, a ne kao direktna procena rizika pri tipičnim nivoima izloženosti u populaciji. Za razliku od PFOS-a, u slučaju PFOA-e dostupni su podaci koji pokazuju da dugotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija nanomolarnim koncentracijama dovodi do značajnih transkriptomskih i funkcijskih promena, uključujući promene u migraciji ćelija, angiogenezi, adheziji monocita i propustljivosti monosloja

endotelnih ćelija (Opacic i sar., 2025). Ovi nalazi ukazuju da je endotel osetljiv i na znatno niže koncentracije PFOA-e kada je izlaganje produženo, pri čemu se efekti razvijaju postepeno i prelaze iz suptilnih molekulskih promena u merljive fenotipske ishode. U tom kontekstu, kombinacija kratkotrajnog mikromolarnog i dugotrajnog nanomolarnog pristupa predstavlja komplementaran okvir: prvi omogućava identifikaciju potencijalnih molekulskih meta i signalnih mreža, dok drugi potvrđuje njihovu biološku relevantnost u uslovima bližim realnoj izloženosti prosečnog čoveka. Ovakav integrisani pristup značajno unapređuje razumevanje efekata PFOA-e na endotel i naglašava potrebu da se procena rizika zasniva na kombinaciji različitih eksperimentalnih režima izlaganja.

6.3. Integracija transkriptomskih podataka i PBTK modelovanja u proceni rizika perfluorooktansulfonata i perfluorooktanske kiseline

U okviru ove doktorske disertacije primenjen je integrisani pristup koji kombinuje eksperimentalne podatke dobijene u uslovima *in vitro* sa PBTK modelovanjem, kao savremena alternativna strategija za procenu rizika po zdravlje ljudi. Ovaj pristup omogućava direktno povezivanje molekulskih odgovora detektovanih na nivou transkriptoma sa spoljašnjom izloženošću, čime se prevazilazi jedno od ključnih ograničenja klasičnih *in vitro* studija – nedostatak kvantitativne veze sa realnim dozama kod ljudi. U tu svrhu, primenjena je analiza BMC-a na dozno-zavisnim transkriptomskim odgovorima nakon kratkotrajnog izlaganja EA.hy926 ćelija PFOS-u i PFOA-i, dok su dobijene vrednosti potom prevedene u HED-ove korišćenjem OPERA-PBTK modela za PFOS i GastroPlus™-PBTK modela za PFOA-u. Parametri doze podešeni su primenom reverzne dozimetrije, kako bi izračunate vrednosti HED-ova odgovarale čoveku referentne telesne mase 85 kg, izražene u μg PFOS-a ili PFOA-e/kg tm/dan. Zbog softverskih ograničenja GastroPlus™-PBTK modela, simulacije za oba jedinjenja su sprovedene za vremenski period od dve godine. Ovakav pristup omogućio je identifikaciju opsega vrednosti HED-ova koji indukuju genske odgovore u endotelnim ćelijama, čime je uspostavljena funkcionalna veza između realnih scenarija izloženosti i bioloških efekata.

U tom kontekstu, važno je dodatno razjasniti izbor eksperimentalnih uslova, posebno primenjenih koncentracija PFOS-a i PFOA-e (1, 10 i 100 μM) i vremena izlaganja (48 h), koji na prvi pogled mogu odstupati od realnih scenarija izloženosti. Naime, koncentracije od 1, 10 i 100 μM nisu odabrane sa ciljem direktnog oponašanja nivoa PFOS-a i PFOA-e u

serumu opšte populacije, niti predstavljaju pokušaj reprodukovanja toksikokinetike u uslovima *in vivo*. Umesto toga, izbor koncentracija bio je vođen potrebom da se obezbedi dovoljno širok koncentracijski opseg koji omogućava pouzdano modelovanje dozno-zavisnih transkriptomskih odgovora i robustno određivanje vrednosti BMC-a u periodu od 48 h. U okviru primenjenog pristupa, nominalne koncentracije u *in vitro* sistemu ne predstavljaju krajnju tačku interpretacije, već služe kao eksperimentalna osnova za definisanje efektivnih koncentracija zasnovanih na modelovanim dozno-zavisnim odnosima. Biološka i regulatorna relevantnost rezultata uspostavlja se tek u narednom koraku, kroz IVIVE i PBTK modelovanje, gde se vrednosti BMC-ova prevode u HED-ove i time direktno povezuju sa realnim nivoima izloženosti kod ljudi. Na taj način, relevantnost za ljudsku populaciju nije određena nominalnim koncentracijama korišćenim u uslovima *in vitro*, već procenjenim spoljašnjim dozama koje odgovaraju predviđenim internim biološki aktivnim koncentracijama. Izbor vremena izlaganja od 48 h takođe treba posmatrati u okviru ovog integrisanog pristupa. Iako PFOS i PFOA imaju dug poluživot u ljudskom organizmu i karakterišu se hroničnom izloženošću tokom više godina, kratkotrajni eksperimenti u uslovima *in vitro* predstavljaju standardni pristup za detekciju ranih molekulskih i ćelijskih perturbacija koje prethode razvoju fenotipskih efekata. Vremenski okvir od 48 h omogućava stabilizaciju transkriptomskog odgovora, uz istovremeno izbegavanje dominacije sekundarnih efekata karakterističnih za dugotrajnu izloženost, kao što su izražena citotoksičnost ili adaptivna reorganizacija ćelijskog odgovora. Relevantnost za hronične uslove izloženosti zatim se uspostavlja kroz PBTK modelovanje, gde se vrednosti BMC-ova projektuju na dugoročne scenarije izloženosti i akumulaciju u organizmu. Zbirno, ovakav integrisani pristup omogućava razdvajanje inicijalnih, mehanistički relevantnih odgovora od kasnijih, nespecifičnih ili sekundarnih efekata, čime se povećava pouzdanost identifikacije biološki značajnih promena i njihova translacija u procenu rizika kod ljudi (Ring i sar., 2017; Lin i Lin, 2020).

Dobijeni rezultati pokazuju da integracija eksperimentalno dobijenih transkriptomskih podataka sa PBTK modelovanjem omogućava kvantitativno poređenje osetljivosti između različitih supstanci i identifikaciju njihovih toksikodinamičkih profila. Analizom gena prema vrednostima HED-ova identifikovane su promene u genskoj ekspresiji u endotelnim ćelijama koje se javljaju pri različitim nivoima izloženosti PFOS-u i PFOA-i. U tom kontekstu, uočena je izrazita razlika između ove dve supstance: PFOA indukuje promene u genskoj ekspresiji pri znatno nižim spoljašnjim dozama u odnosu na PFOS (~40

puta), što se ogleda u značajno nižoj P50 vrednosti HED-a (0,538 μg/kg tm/dan za PFOA-u naspram 21,69 μg/kg tm/dan za PFOS). Ovaj nalaz je u skladu sa konceptom da različita PFAS jedinjenja, uprkos strukturnoj srodnosti, mogu imati različite profile toksikodinamičke potentnosti na nivou ciljnog tkiva (EFSA, 2020; Rowan-Carroll i sar., 2021). Važno je naglasiti da niža vrednost HED-a ne znači nužno veći ukupni rizik, već ukazuje na veću sposobnost supstance da inicira rane molekulske promene pri nižim dozama.

Na nivou pojedinačnih gena, PFOS pokazuje relativno viši prag aktivacije. Kao najosetljiviji gen izdvojio se *HOMEZ* (HED = 3,92 μg/kg tm/dan) koji je važan transkripcioni regulator, naročito tokom embrionalnog razvoja. Iako do danas nisu opisani direktni efekti ovog gena na KVS, njegova ekspresija povezana je sa razvojnim procesima u različitim tkivima (Yue i sar., 2022; Bayarsaihan i sar., 2003). Relativnu osetljivost je pokazao i gen *NBPF26* (HED = 8,68 μg/kg tm/dan) koji učestvuje u vezivanju jona Ca^{2+} i ćelijskoj signalizaciji, ključnim procesima za regulaciju vaskularnog tonusa i funkciju endotela. Nešto viši prag osetljivosti na PFOS pokazali su geni *CTHRC1*, *KHDC1* i *NOTUM* (HED = 10,05–11,48 μg/kg tm/dan), što ukazuje da se ključni procesi kao što su vaskularno remodelovanje, reparacija endotela i signalizacija preko Wnt (Foulquier i sar., 2018; Liu i sar., 2023), aktiviraju tek pri višim spoljašnjim dozama. Ipak, treba imati u vidu da su ove vrednosti iznad tipičnih nivoa izloženosti opšte populacije, što ograničava njihovu direktnu translaciju u realni rizik, ali ih čini relevantnim kao PoD-ove u regulatornom kontekstu.

Nasuprot tome, PFOA pokazuje znatno širi spektar vrednosti HED-ova pomeren ka nižim dozama, sa izuzetno niskim pragovima za gene *IRX3* (0,0004 μg/kg tm/dan) i *FRRS1* (0,0023 μg/kg tm/dan). Vrednost HED-a za *IRX3* je približno 9800 puta niža od vrednosti HED-a za *HOMEZ*, najosetljiviji gen na izlaganje PFOS-u, dok je za *FRRS1* oko 3775 puta niža od vrednosti HED-a za *NBPF26*, drugi najosetljiviji gen na izlaganje PFOS-u. Ovako visoka osetljivost ukazuje da PFOA može aktivirati rane signalne puteve pri dozama koje su bliske ili čak ispod realnih nivoa izloženosti u nekim populacijama. Funkcionalno, *IRX3* je povezan sa regulacijom električne provodljivosti i signalizacijom preko GJ (Zhang i sar., 2011; Gaborit i sar., 2012). Iako prevashodno proučavan u srčanom tkivu, ekspresija *IRX3* u endotelnim ćelijama može ukazati na njegovu ulogu u elektrohemijskoj homeostazi i signalizaciji, što može biti ključno za ranu aktivaciju endotela nakon izlaganja ksenobioticima poput PFOA-e. Nedavna istraživanja su pokazala da *FRRS1* učestvuje u zaštiti od oksidativnog stresa i regulaciji ćelijskog odgovora na oštećenja (Liang i sar., 2024). Dodatno, geni *SERTAD3*, *AGFG1* i *SFXN2* (vrednosti HED-ova u rasponu od 0,106–0,195

μg/kg tm/dan) ukazuju na uključenost proliferacije, angiogeneze i funkcije mitohondrija, što je u skladu sa poznatim efektima PFAS na metaboličke i proliferativne puteve (Wang i sar., 2021; Ojo i sar., 2022).

Ukupno posmatrano, ovi rezultati ukazuju da PFOA izaziva raniju i širu aktivaciju endotela u odnosu na PFOS. Ova razlika može se delimično objasniti toksikokinetičkim svojstvima ovih supstanci. Funkcionalna grupa kod PFOS-a je sulfonatna, dok je kod PFOA-e karboksilna, što utiče na njihovo vezivanje za proteine, intracelularnu distribuciju i eliminaciju iz organizma (Zhao i sar., 2023). Pored toga, PFOS odlikuje izraženiji bioakumulacioni potencijal u organizmu čoveka i duži poluživot u odnosu na PFOA-u, kao posledica jačeg vezivanja za proteine plazme i sporijeg poluvremena eliminacije (Olsen i sar., 2007; Li i sar., 2018). Ove razlike utiču na efektivne unutrašnje koncentracije i mogu objasniti zašto PFOA pokazuje jači efekat pri nižim spoljašnjim dozama u ovom modelu. Dodatno, treba uzeti u obzir da su korišćeni različiti PBTK modeli, kao i da usled ograničenja u programu GastroPlus™ nije bilo moguće sprovesti simulacije duže od dve godine (16 000 h), što može doprineti varijabilnosti procenjenih vrednosti HED-ova. Ovo predstavlja važno metodološko ograničenje studije, budući da razlike u strukturi modela, parametrizaciji i pristupu simulaciji mogu uticati na procenjene vrednosti HED-ova nezavisno od stvarnih bioloških razlika između supstanci. Stoga poređenje HED i BER vrednosti između PFOS-a i PFOA-e treba tumačiti sa izvesnom rezervom, jer deo uočenih razlika može odražavati razlike u primenjenim modelima, a ne isključivo toksikodinamičke karakteristike ispitivanih jedinjenja.

Vrednosti HED-ova su u narednom koraku identifikovane kao PoD-ovi i korišćene kao referentne tačke za probabilističku procenu rizika na nivou populacija primenom BER-a. Ova procena zasnovana je na integraciji dostupnih podataka o koncentracijama PFOS-a i PFOA-e u serumu u opštim i profesionalno izloženim populacijama, čime je omogućeno kvantitativno povezivanje transkriptomskih podataka sa realnim scenarijima izloženosti u različitim populacijama širom sveta. Vrednosti BER-ova izračunate su poređenjem P50 i P5 vrednosti HED-ova svih gena nakon izlaganja PFOS-u i PFOA-i, sa procenjenim nivoima izloženosti u različitim populacijama. Uočene su značajne razlike u vrednosti BER-ova između opštih i profesionalno izloženih populacija. Visoke vrednosti BER-ova u opštim populacijama ukazuju na značajnu marginu između biološki aktivnih doza koje dovode do promena u ekspresiji gena u endotelnim ćelijama i realne izloženosti PFOS-u i PFOA-i. Najviše vrednosti BER-ova u zapadnoevropskim populacijama za PFOS i srednjeevropskim

za PFOA-u rezultuju većom marginom bezbednosti, što ukazuje na niži procenjeni rizik u poređenju sa drugim regionima. Razlog za to potencijalno leži u činjenici da se u tim regionima primenjuje stroža regulativa, a s tim u vezi, i odgovarajuće mere usmerene na smanjenje nivoa PFAS u radnom i životnom okruženju. Naime, upotreba PFOS-a i PFOA-e je ograničena u okviru Stokholmske konvencije o perzistentnim organskim zagađivačima, dok je u Evropskoj uniji dodatno regulisana kroz regulativu REACH, koja ograničava proizvodnju i upotrebu PFAS. Pored toga, Evropski parlament je 2019. godine uveo stroga ograničenja za dozvoljene koncentracije PFAS u vodi za piće, postavljajući granicu na 0,5 μM, što je dodatno uticalo na smanjenje izloženosti opšte populacije ovim jedinjenjima (Qiu i sar., 2016; Espartero i sar., 2022; López-Vázquez i sar., 2024).

S druge strane, u profesionalno izloženim populacijama vrednosti BER-ova su značajno niže, što ukazuje na usku marginu između biološki aktivnih doza koje dovode do promena u ekspresiji gena u endotelnim ćelijama i realnih nivoa izloženosti, odnosno na potencijalno povećan rizik u profesionalno izloženim populacijama. Zanimljivo je da su penzionisani radnici fabrike 3M u Decatur i Cottage Grove u SAD (populacija O2) imali najnižu vrednost BER_{P50} za PFOS – 3,8. Razlog za to leži u činjenici da su SAD istorijski predstavljale jedno od glavnih područja za proizvodnju i upotrebu PFAS u industriji i potrošačkim proizvodima (O'Sullivan Bakshi i sar., 2025), što je rezultovalo većim stepenom izlaganja stanovništva, a posebno radnika u industrijama baziranim na proizvodnji i upotrebi PFAS. Kada je u pitanju PFOS, samo još dve profesionalno izložene populacije su imale vrednosti BER-ova manje od 100: u populaciji O1 (vatrogasci u Australiji koji su bili izloženi PFOS-u preko AFFF pene za gašenje požara) vrednost BER-a iznosi 59, dok u populaciji O5 (radnici fabrike za proizvodnju perfluorisanih hemikalija Changshu u Kini) iznosi 71, što ukazuje na umereni rizik. Nasuprot tome, u populacijama koje su profesionalno izložene PFOA-i vrednosti BER-ova su značajno niže i u većini slučajeva su ispod 100, a u pojedinim populacijama i ispod 1. Najniže vrednosti BER-ova zabeležene su u populacijama O5 (radnici fabrike Changshu u Kini), O2 (radnici fabrike 3M u Antwerp, Belgija, i Decatur i Cottage Grove, SAD) i O1 (radnici fabrike Henxin Chemical Plant u Hubei, Kina), gde su vrednosti BER_{P50} iznosile 0,8, 1,3 i 2,6, redom. Ovakve vrednosti BER-ova ukazuju na izrazito smanjenu marginu između biološki aktivnih doza koje utiču na ekspresiju gena u endotelnim ćelijama i realne izloženosti, odnosno na potencijalno visok rizik za ove profesionalno izložene populacije. U populacijama O3 (radnici koji nanose vosak na skije tokom sezone skijanja u Norveškoj) i O4 (sezonski radnici izloženi vosku za skije u

Švedskoj) uočene su nešto više vrednosti BER-ova u odnosu na ostale profesionalno izložene grupe, ali i dalje značajno niže u poređenju sa opštim populacijama. Ove vrednosti ukazuju na postojanje ograničene margine izloženosti i potencijalno povećan rizik, naročito kada se uzmu u obzir konzervativnije procene zasnovane na vrednosti P5, koje reflektuju najosetljivije gene.

Pored toga, za obe analizirane supstance izračunata je vrednost BER-a za pojedinačne gene kroz populacije. Posebno je značajno da su geni sa najnižim vrednostima HED-ova dosledno pokazivali najniže vrednosti BER-ova kroz populacije, što potvrđuje njihovu ulogu kao najosetljivijih molekularnih indikatora rizika. Kod PFOS-a se posebno ističe gen *HOMEZ*, koji pokazuje vrednosti BER-ova u opsegu 1–100 kod svih profesionalno izloženih populacija (izuzev O2, gde je BER < 1), kao i kod nekih opštih populacija (G1, G2, G6–G8). Kod PFOA-e se naročito ističu geni *IRX3* i *FRRS1*, za koje je pokazano da su vrednosti BER-ova u svim opštim populacijama < 100, dok su u svim profesionalno izloženim populacijama < 1. U populaciji O5 vrednost BER-a < 1 ima i gen *SERTAD3*. Ovi geni predstavljaju potencijalne "rane biomarkere upozorenja" koji mogu biti korišćeni za identifikaciju populacija sa povećanom osetljivošću na PFAS.

Zbirno, rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji potvrđuju da integracija transkriptomskih podataka i PBTK modelovanja predstavlja moćan alat za kvantitativnu procenu rizika koji omogućava prelaz sa deskriptivnih podataka dobijenih u uslovima *in vitro* na metrike izloženosti relevantne u regulatornom kontekstu. Ovakav pristup ne samo da povećava biološku i translacionu relevantnost eksperimentalnih podataka, već pruža i fleksibilnu platformu za procenu velikog broja PFAS supstanci, čime doprinosi razvoju savremenih strategija procene rizika u skladu sa principima smanjenja upotrebe životinja i unapređenja eksperimentalnih modela relevantnih za čoveka (Ring i sar., 2017; Krewski i sar., 2020).

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu sveobuhvatne analize eksperimentalnih i modelovanih podataka dobijenih u okviru ove doktorske disertacije može se zaključiti da kratkotrajno izlaganje makrovaskularnih endotelnih ćelija čoveka odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS-a i PFOA-e u uslovima *in vitro* ne dovodi do izraženih promena u većini ispitivanih funkcijskih parametara endotela. Ipak, PFOS ispoljava umerene efekte na pojedine funkcijske karakteristike, posebno u domenu angiogeneze i ćelijske adhezije, što ukazuje na njegov veći potencijal za ranu funkcijsku modulaciju endotela u odnosu na PFOA-u. Nasuprot tome, PFOA u datim uslovima ne dovodi do merljivih promena funkcijskog fenotipa. Uprkos relativno očuvanom funkcionalnom statusu ćelija, oba jedinjenja indukuju značajne promene na nivou transkriptoma, što ukazuje da molekulski odgovori predstavljaju osetljiviji i raniji indikator biološkog efekta u odnosu na klasične funkcijske parametre. Ovi nalazi potvrđuju da transkriptomske promene prethode razvoju izraženijih funkcijskih poremećaja i mogu predstavljati rane biomarkere odgovora endotelnih ćelija na izlaganje PFAS.

Specifični zaključci ove doktorske disertacije su sledeći:

- Kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija PFOS-u (1, 10 i 100 μM) dovodi do selektivnih promena u funkcijskim parametrima endotela, koje se ogledaju u povećanoj adheziji za fibronektin i smanjenom formiranju endotelnih tubula, uz istovremeno smanjenje ekspresije ključnih markera angiogeneze (VEGF-A, VEGFR-2 i PECAM-1). Istovremeno, PFOS ne utiče značajno na vijabilnost ćelija, apoptozu, nekrozu, ćelijski ciklus, migraciju, adheziju monocita za endotelne ćelije, propustljivost endotelnog monosloja, kao ni na stvaranje ROS-a i NO-a.

- Perfluorooktansulfonat indukuje promene u globalnoj ekspresiji gena u EA.hy926 ćelijama, pri čemu je uočen nelinearan i koncentraciono-zavisan obrazac odgovora: najveći broj DEG-ova identifikovan pri najnižoj koncentraciji, dok se sa porastom koncentracije povećava intenzitet inhibicije genske ekspresije. Niže koncentracije PFOS-a primarno utiču na regulatorne i signalne procese, dok više koncentracije aktiviraju metaboličke puteve povezane sa detoksikacijom, što ukazuje na prelazak sa regulatornih promena ka metaboličkoj adaptaciji pri većem opterećenju ćelije.

- Kratkotrajno izlaganje EA.hy926 ćelija PFOA-i (1, 10 i 100 μM) ne dovodi do značajnih promena u ispitivanim funkcijskim odgovorima uključujući vijabilnost, broj ćelija u apoptozi i nekrozi, raspodeli ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, migraciju, adheziju za fibronektin, formiranje endotelnih tubula, vezivanje monocita za endotelne ćelije, propustljivost monosloja endotelnih ćelija, kao ni stvaranje ROS-a i NO-a.

- Perfluorooktanska kiselina izaziva izražen i jasno koncentraciono-zavisan transkriptomski odgovor, pri čemu se broj DEG-ova povećava sa porastom koncentracije. Pri najnižim koncentracijama dominantne su promene povezane sa hromatinskom organizacijom i regulacijom transkripcije, dok više koncentracije dovode do aktivacije širokog spektra signalnih puteva, uključujući procese razvoja, morfogeneze, metabolizma i remodelovanja ECM-a. Ovi nalazi ukazuju na progresiju od ranih epigenetskih promena ka kompleksnijim regulatornim i funkcionalnim odgovorima pri višim koncentracijama PFOA-e.

- Integracija transkriptomskih podataka sa PBTK modelovanjem omogućila je kvantitativno prevođenje efekata dobijenih u uslovima *in vitro* u HED-ove, čime je uspostavljena veza između molekulskih odgovora i realnih scenarija izloženosti kod ljudi. Pokazano je da PFOA indukuje promene u genskoj ekspresiji pri znatno nižim spoljašnjim dozama u odnosu na PFOS (~40 puta), što može ukazivati na veću toksikodinamičku potentnost na nivou transkriptoma. Međutim, ovo poređenje treba tumačiti sa oprezom, imajući u vidu da su za PFOS i PFOA-u primenjeni različiti PBTK modeli, što može uticati na dobijene vrednosti HED-ova. Najosetljiviji geni (npr. *HOMEZ*, *IRX3*, *FRRS1*) identifikovani na osnovu najnižih vrednosti HED-ova predstavljaju potencijalne PoD-ove za procenu rizika. Ovi geni pokazuju dosledno niže vrednosti BER-ova kroz različite populacije, što potvrđuje njihovu ulogu kao osetljivih molekularnih indikatora rizika.

- Analiza BER-ova je ukazala na značajne razlike između opštih i profesionalno izloženih populacija. Visoke vrednosti BER-ova u opštim populacijama ukazuju na postojanje adekvatne margine bezbednosti, dok niske vrednosti BER-ova u profesionalno izloženim populacijama ukazuju na smanjenu marginu između biološki aktivnih doza koje dovode do promena u ekspresiji gena u endotelnim ćelijama i realne izloženosti, odnosno na potencijalno povećan rizik. Utvrđeno je da za PFOS postoji umeren rizik u pojedinim profesionalno izloženim populacijama, dok je za PFOA-u utvrđena znatno manja margina bezbednosti, u nekim slučajevima BER < 1.

- Dobijeni rezultati potvrđuju da integracija *in vitro* i *in silico* pristupa predstavlja efikasan i pouzdan alat za savremenu procenu rizika izloženosti PFAS, s obzirom da omogućava prelaz sa deskriptivnih bioloških odgovora ka kvantitativnim metrikama izloženosti relevantnim za čoveka.

Ukupno posmatrano, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da PFOS i PFOA, uprkos ograničenim funkcijskim efektima u uslovima kratkotrajnog izlaganja, indukuju rane i biološki značajne transkriptomske promene u endotelnim ćelijama, koje mogu predstavljati inicijalne korake u razvoju endotelne disfunkcije. Ovi nalazi naglašavaju značaj primene transkriptomskih pristupa i integrisanog modelovanja u identifikaciji ranih efekata izloženosti hemikalijama i unapređenju strategija procene rizika u savremenoj toksikologiji.

8. LITERATURA

Abdullah, R., Alhusainy, W., Woutersen, J., Rietjens, I. M. C. M., i Punt, A. (2016). Predicting points of departure for risk assessment based on in vitro cytotoxicity data and physiologically based kinetic (PBK) modeling: The case of kidney toxicity induced by aristolochic acid I. *Food and Chemical Toxicology*, *92*, 104–116. https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.017

Abhinand, C. S., Raju, R., Soumya, S. J., Arya, P. S., i Sudhakaran, P. R. (2016). VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *Journal of Cell Communication and Signaling*, *10*(4), 347–354. https://doi.org/10.1007/s12079-016-0352-8

Adams, R. H., i Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(6), 464–478. https://doi.org/10.1038/nrm2183

Addicks, G. C., Rowan-Carroll, A., Reardon, A. J. F., Leingartner, K., Williams, A., Meier, M. J., Moffat, I., Carrier, R., Lorusso, L., Wetmore, B. A., Yauk, C. L., i Atlas, E. (2023). Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in mixtures show additive effects on transcriptomic points of departure in human liver spheroids. *Toxicological Sciences*, *194*(1), 38–52. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfad044

Aguilar, G., Koning, T., Ehrenfeld, P., i Sánchez, F. A. (2020). Role of NO and S-nitrosylation in the Expression of Endothelial Adhesion Proteins That Regulate Leukocyte and Tumor Cell Adhesion. *Frontiers in Physiology*, *11*, 595526. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.595526

Ahn, K., Pan, S., Beningo, K., i Hupe, D. (1995). A permanent human cell line (EA.hy926) preserves the characteristics of endothelin converting enzyme from primary human umbilical vein endothelial cells. *Life Sciences*, *56*(26), 2331–2341. https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)00227-W

Aird, W. C. (2007). Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: I. Structure, Function, and Mechanisms. *Circulation Research*, *100*(2), 158–173. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a

Alexander-Dann, B., Pruteanu, L. L., Oerton, E., Sharma, N., Berindan-Neagoe, I., Módos, D., i Bender, A. (2018). Developments in toxicogenomics: Understanding and predicting compound-induced toxicity from gene expression data. *Molecular Omics*, *14*(4), 218–236. https://doi.org/10.1039/C8MO00042E

Andersen, M., McMullen, P. D., Phillips, M. B., Yoon, M., Pendse, S. N., Clewell, H. J., Hartman, J. K., Moreau, M., Becker, R. A., i Clewell, R. A. (2019). Developing context appropriate toxicity testing approaches using new alternative methods (NAMs). *ALTEX*, 532–534. https://doi.org/10.14573/altex.1906261

Anđelković, Z., Somer, L., Avramović, V., Milosavljević, Z., Tanasković, I., Matavulj, M., Perović, M., Nikolić, I., Rangić, G., Lalošević, D., Milenkova, L., Danilović, V., i Petrović, A. (2009). *Histologija*. Niš (Srbija): Impressum, Prvomajska 14

Antignac, J. P., Veyrand, B., Kadar, H., Marchand, P., Oleko, A., Bizec, B. L., i Vandentorren, S. (2013). Occurrence of perfluorinated alkylated substances in breast milk of French women and relation with socio-demographical and clinical parameters: Results of the ELFE pilot study. *Chemosphere*, *91*(6), 802–808. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.088

Arnaoutova, I., i Kleinman, H. K. (2010). In vitro angiogenesis: Endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nature Protocols*, *5*(4), 628–635. https://doi.org/10.1038/nprot.2010.6

Arredondo Eve, A., Tunc, E., Mehta, D., Yoo, J. Y., Yilmaz, H. E., Emren, S. V., Akçay, F. A., i Madak Erdogan, Z. (2024). PFAS and their association with the increased risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Toxicological Sciences*, *200*(2), 312–323. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfae065

Ashby, A., Murphy, O., Jukosky, J., i Whipple, C. (2024). The Effects of Perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) on Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Proliferation and Gene Expression and its Implications on Fetal Development. *MicroPublication Biology*, *2024*. https://doi.org/10.17912/micropub.biology.001318

Attema, B., Janssen, A. W. F., Rijkers, D., Van Schothorst, E. M., Hooiveld, G. J. E. J., i Kersten, S. (2022). Exposure to low-dose perfluorooctanoic acid promotes hepatic steatosis and disrupts the hepatic transcriptome in mice. *Molecular Metabolism*, *66*, 101602. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101602

Augustin, H. G., Young Koh, G., Thurston, G., i Alitalo, K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*(3), 165–177. https://doi.org/10.1038/nrm2639

Averina, M., Brox, J., Huber, S., i Furberg, A.-S. (2021). Exposure to perfluoroalkyl substances (PFAS) and dyslipidemia, hypertension and obesity in adolescents. The

Fit Futures study. *Environmental Research*, *195*, 110740. https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110740

Badry, A., Lämmer, R., Göckener, B., i Koschorreck, J. (2025). Pre-regulatory actions as a driver for reduced PFAS emissions? Long-term trends and change points for human and environmental samples from Germany. *Environmental Sciences Europe*, *37*, 84. https://doi.org/10.1186/s12302-025-00954-0

Bai, Z., Luo, Y., i Tian, L. (2022). *ERCC5*, *HES6* and *RORA* are potential diagnostic markers of coronary artery disease. *FEBS Open Bio*, *12*(10), 1814–1827. https://doi.org/10.1002/2211-5463.13469

Baranska, P., Jerczynska, H., Pawlowska, Z., Koziolkiewicz, W., i Cierniewski, C. S. (2005). Expression of Integrins and Adhesive Properties of Human Endothelial Cell Line EA.hy 926. *Cancer Genomics Proteomics,* *2*(5):265-269. https://doi.org/10.21873/cgp.2005.0053

Barber, A. J., i Antonetti, D. A. (2003). Mapping the Blood Vessels with Paracellular Permeability in the Retinas of Diabetic Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *44*(12), 5410. https://doi.org/10.1167/iovs.03-0244

Bartell, S. M., Calafat, A. M., Lyu, C., Kato, K., Ryan, P. B., i Steenland, K. (2010). Rate of Decline in Serum PFOA Concentrations after Granular Activated Carbon Filtration at Two Public Water Systems in Ohio and West Virginia. *Environmental Health Perspectives*, *118*(2), 222–228. https://doi.org/10.1289/ehp.0901252

Batzella, E., Girardi, P., Russo, F., Pitter, G., Da Re, F., Fletcher, T., i Canova, C. (2022). Perfluoroalkyl substance mixtures and cardio-metabolic outcomes in highly exposed male workers in the Veneto Region: A mixture-based approach. *Environmental Research*, *212*, 113225. https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113225

Batzella, E., Rosato, I., Pitter, G., Da Re, F., Russo, F., Canova, C., i Fletcher, T. (2024). Determinants of PFOA Serum Half-Life after End of Exposure: A Longitudinal Study on Highly Exposed Subjects in the Veneto Region. *Environmental Health Perspectives*, *132*(2), 027002. https://doi.org/10.1289/EHP13152

Bayarsaihan, D., Enkhmandakh, B., Makeyev, A., Greally, J. M., Leckman, J. F., i Ruddle, F. H. (2003). *Homez*, a homeobox leucine zipper gene specific to the vertebrate lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(18), 10358–10363. https://doi.org/10.1073/pnas.1834010100

Bazzoni, G., i Dejana, E. (2004). Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis. *Physiological Reviews*, *84*(3), 869–901. https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2003

Bennett, E. P., Mandel, U., Clausen, H., Gerken, T. A., Fritz, T. A., i Tabak, L. A. (2012). Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology*, *22*(6), 736–756. https://doi.org/10.1093/glycob/cwr182

Berg, E. L., Robinson, M. K., Warnock, R. A., i Butcher, E. C. (1991). The human peripheral lymph node vascular addressin is a ligand for LECAM-1, the peripheral lymph node homing receptor. *The Journal of Cell Biology*, *114*(2), 343–349. https://doi.org/10.1083/jcb.114.2.343

Bhatnagar, A. (2017). Environmental Determinants of Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, *121*(2), 162–180. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.306458

Bouïs, D., Hospers, G. A. P., Meijer, C., Molema, G., i Mulder, N. H. (2001). Endothelium in vitro: A review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis*, *4*(2), 91–102. https://doi.org/10.1023/A:1012259529167

Bryan, B. A., i D'Amore, P. A. (2007). What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *64*(16), 2053–2065. https://doi.org/10.1007/s00018-007-7008-z

Buck, R. C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J. M., Cousins, I. T., De Voogt, P., Jensen, A. A., Kannan, K., Mabury, S. A., i Van Leeuwen, S. P. (2011). Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: Terminology, classification, and origins. *Integrated Environmental Assessment and Management*, *7*(4), 513–541. https://doi.org/10.1002/ieam.258

Buhrke, T., Krüger, E., Pevny, S., Rößler, M., Bitter, K., i Lampen, A. (2015). Perfluorooctanoic acid (PFOA) affects distinct molecular signalling pathways in human primary hepatocytes. *Toxicology*, *333*, 53–62. https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.04.004

Camaré, C., Pucelle, M., Nègre-Salvayre, A., i Salvayre, R. (2017). Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. *Redox Biology*, *12*, 18–34. https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.007

Cao, L., Guo, Y., Chen, Y., Hong, J., Wu, J., i Hangbiao, J. (2022). Per-/polyfluoroalkyl substance concentrations in human serum and their associations with liver cancer. *Chemosphere*, *296*, 134083. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134083

Cao, W., Horzmann, K., Schemera, B., Petrofski, M., Kendall, T., Spooner, J., Rynders, P. E., VandeBerg, J. L., i Wang, X. (2023). Blood transcriptome responses to PFOA and GenX treatment in the marsupial biomedical model Monodelphis domestica. *Frontiers in Genetics*, *14*, 1073461. https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1073461

Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, *9*(6), 653–660. https://doi.org/10.1038/nm0603-653

Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, *438*(7070), 932–936. https://doi.org/10.1038/nature04478

Carmeliet, P., i Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, *473*(7347), 298–307. https://doi.org/10.1038/nature10144

Carpentier, G., Berndt, S., Ferratge, S., Rasband, W., Cuendet, M., Uzan, G., i Albanese, P. (2020). Angiogenesis Analyzer for ImageJ — A comparative morphometric analysis of "Endothelial Tube Formation Assay" and "Fibrin Bead Assay". *Scientific Reports*, *10*(1), 11568. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67289-8

Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., Melino, G., i Raschellà, G. (2017). Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discovery*, *3*(1), 17071. https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.71

Cerutti, C., i Ridley, A. J. (2017). Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Experimental Cell Research*, *358*(1), 31–38. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.06.003

Chanput, W., Peters, V., i Wichers, H. (2015). THP-1 and U937 Cells. U K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, i H. Wichers (Ur.), *The Impact of Food Bioactives on Health* (str. 147–159). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_14

Chen, H., Peng, C., Fang, F., Li, Y., Liu, X., Hu, Y., Wang, G., Liu, X., i Shen, Y. (2025). Angiogenesis within atherosclerotic plaques: Mechanical regulation, molecular mechanism and clinical diagnosis. *Mechanobiology in Medicine*, *3*(1), 100114. https://doi.org/10.1016/j.mbm.2025.100114

Chen, M., Du, R., Zhang, T., Li, C., Bao, W., Xin, F., Hou, S., Yang, Q., Chen, L., Wang, Q., i Zhu, A. (2023). The Application of a Physiologically Based Toxicokinetic Model in Health Risk Assessment. *Toxics*, *11*(10), 874. https://doi.org/10.3390/toxics11100874

Chou, W.-C., i Lin, Z. (2020). Probabilistic human health risk assessment of perfluorooctane sulfonate (PFOS) by integrating in vitro, in vivo toxicity, and human epidemiological

studies using a Bayesian-based dose-response assessment coupled with physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling approach. *Environment International*, *137*, 105581. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105581

Christensen, B. T., i Calkins, M. M. (2023). Occupational exposure to per- and polyfluoroalkyl substances: A scope review of the literature from 1980–2021. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, *33*(5), 673–686. https://doi.org/10.1038/s41370-023-00536-y

Cohen Hubal, E. A., Wetmore, B. A., Wambaugh, J. F., El-Masri, H., Sobus, J. R., i Bahadori, T. (2019). Advancing internal exposure and physiologically-based toxicokinetic modeling for 21st-century risk assessments. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, *29*(1), 11–20. https://doi.org/10.1038/s41370-018-0046-9

Cong, X., i Kong, W. (2020). Endothelial tight junctions and their regulatory signaling pathways in vascular homeostasis and disease. *Cellular Signalling*, *66*, 109485. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109485

Coperchini, F., Greco, A., i Rotondi, M. (2024). Changing the structure of PFOA and PFOS: A chemical industry strategy or a solution to avoid thyroid-disrupting effects? *Journal of Endocrinological Investigation*, *47*(8), 1863–1879. https://doi.org/10.1007/s40618-024-02339-w

Corada, M., Mariotti, M., Thurston, G., Smith, K., Kunkel, R., Brockhaus, M., Lampugnani, M. G., Martin-Padura, I., Stoppacciaro, A., Ruco, L., McDonald, D. M., Ward, P. A., i Dejana, E. (1999). Vascular endothelial–cadherin is an important determinant of microvascular integrity *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(17), 9815–9820. https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9815

Corsini, E., Luebke, R. W., Germolec, D. R., i DeWitt, J. C. (2014). Perfluorinated compounds: Emerging POPs with potential immunotoxicity. *Toxicology Letters*, *230*(2), 263–270. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.038

Cosselman, K. E., Navas-Acien, A., i Kaufman, J. D. (2015). Environmental factors in cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, *12*(11), 627–642. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.152

Cousins, I. T., DeWitt, J. C., Glüge, J., Goldenman, G., Herzke, D., Lohmann, R., Ng, C. A., Scheringer, M., i Wang, Z. (2020). The high persistence of PFAS is sufficient for their management as a chemical class. *Environmental Science: Processes & Impacts*, *22*(12), 2307–2312. https://doi.org/10.1039/D0EM00355G

Cui, J., Wang, P., Yan, S., Liang, Y., Liu, D., i Ren, S. (2022). Perfluorooctane Sulfonate Induces Dysfunction of Human Umbilical Vein Endothelial Cells via Ferroptosis Pathway. *Toxics*, *10*(9), 503. https://doi.org/10.3390/toxics10090503

Cyr, A. R., Huckaby, L. V., Shiva, S. S., i Zuckerbraun, B. S. (2020). Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Critical Care Clinics*, *36*(2), 307–321. https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.009

Dalal, P. J., Muller, W. A., i Sullivan, D. P. (2020). Endothelial Cell Calcium Signaling during Barrier Function and Inflammation. *The American Journal of Pathology*, *190*(3), 535–542. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.11.004

Dangudubiyyam, S. V., Bosse, B., Yadav, P., Song, R., Hofmann, A., Mishra, J. S., i Kumar, S. (2023). Restoring Angiotensin Type 2 Receptor Function Reverses PFOS-Induced Vascular Hyper-Reactivity and Hypertension in Pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(18), 14180. https://doi.org/10.3390/ijms241814180

Dangudubiyyam, S. V., Mishra, J. S., Song, R., i Kumar, S. (2022). Maternal perfluorooctane sulfonic acid exposure during rat pregnancy causes hypersensitivity to angiotensin II and attenuation of endothelium-dependent vasodilation in the uterine arteries. *Biology of Reproduction*, ioac141. https://doi.org/10.1093/biolre/ioac141

Dangudubiyyam, S. V., Mishra, J. S., Zhao, H., i Kumar, S. (2020). Perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) exposure during pregnancy increases blood pressure and impairs vascular relaxation mechanisms in the adult offspring. *Reproductive Toxicology*, *98*, 165–173. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.09.008

Davidsen, N., Ramhøj, L., Kugathas, I., Evrard, B., Darde, T. A., Chalmel, F., Svingen, T., i Rosenmai, A. K. (2022). PFOS disrupts key developmental pathways during hiPSC-derived cardiomyocyte differentiation in vitro. *Toxicology in Vitro*, *85*, 105475. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105475

Davis, A. P., Wiegers, T. C., Johnson, R. J., Sciaky, D., Wiegers, J., i Mattingly, C. J. (2023b). Comparative Toxicogenomics Database (CTD): Update 2023. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D1257–D1262. https://doi.org/10.1093/nar/gkac833

Davis, A. P., Wiegers, T. C., Wiegers, J., Wyatt, B., Johnson, R. J., Sciaky, D., Barkalow, F., Strong, M., Planchart, A., i Mattingly, C. J. (2023a). CTD tetramers: A new online tool that computationally links curated chemicals, genes, phenotypes, and diseases to inform molecular mechanisms for environmental health. *Toxicological Sciences*, *195*(2), 155–168. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfad069

Deanfield, J. E., Halcox, J. P., i Rabelink, T. J. (2007). Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance. *Circulation*, *115*(10), 1285–1295. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859

Dejana, E., Orsenigo, F., i Lampugnani, M. G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of Cell Science*, *121*(13), 2115–2122. https://doi.org/10.1242/jcs.017897

Deng, P., Wang, C., Wahlang, B., Sexton, T., Morris, A. J., i Hennig, B. (2020). Co-exposure to PCB126 and PFOS increases biomarkers associated with cardiovascular disease risk and liver injury in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *409*, 115301. https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115301

DeWitt, J. C., Blossom, S. J., i Schaider, L. A. (2019). Exposure to per-fluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances leads to immunotoxicity: Epidemiological and toxicological evidence. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, *29*(2), 148–156. https://doi.org/10.1038/s41370-018-0097-y

Domingo, J. L. (2025). A review of the occurrence and distribution of Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in human organs and fetal tissues. *Environmental Research*, *272*, 121181. https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.121181

Dorland, Y. L., i Huveneers, S. (2017). Cell–cell junctional mechanotransduction in endothelial remodeling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *74*(2), 279–292. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2325-8

Drummond, G. R., i Sobey, C. G. (2014). Endothelial NADPH oxidases: Which NOX to target in vascular disease? *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *25*(9), 452–463. https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.06.012

Dourson, M., i Gadagbui, B. (2021). The Dilemma of perfluorooctanoate (PFOA) human half-life. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *126*, 105025. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.105025

Dulak, J., i Józkowicz, A. (2003). Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Synthesis by Nitric Oxide: Facts and Controversies. *Antioxidants & Redox Signaling*, *5*(1), 123–132. https://doi.org/10.1089/152308603321223612

Dvorak, H. F. (2002). Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor: A Critical Cytokine in Tumor Angiogenesis and a Potential Target for Diagnosis and Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, *20*(21), 4368–4380. https://doi.org/10.1200/JCO.2002.10.088

Edgar, K. S., Cunning, C., Gardiner, T. A., i McDonald, D. M. (2023). BH4 supplementation reduces retinal cell death in ischaemic retinopathy. *Scientific Reports*, *13*(1), 21292. https://doi.org/10.1038/s41598-023-48167-5

Edgell, C. J., McDonald, C. C., i Graham, J. B. (1983). Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *80*(12), 3734–3737. https://doi.org/10.1073/pnas.80.12.3734

Edgell, C.-J. S., Haizlip, J. E., Bagnell, C. R., Packenham, J. P., Harrison, P., Wilbourn, B., i Madden, V. J. (1990). Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EA.hy926. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, *26*(12), 1167–1172. https://doi.org/10.1007/BF02623694

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (EFSA CONTAM Panel), Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. (Ron), Leblanc, J., Nebbia, C. S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Vleminckx, C., Wallace, H., Barregård, L., Ceccatelli, S., … Schwerdtle, T. (2020). Risk to human health related to the presence of perfluoroalkyl substances in food. *EFSA Journal*, *18*(9). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6223

Elcombe, C. R., Wolf, C. R., i Weswood, A. L. (2011). *US Patent Application Publication* (Patent US 2013/0029928). https://patentimages.storage.googleapis.com/24/ee/73/f58267c7d70dde/WO2011101643A1pdf

Emmett, E. A., Zhang, H., Shofer, F. S., Freeman, D., Rodway, N. V., Desai, C., i Shaw, L. M. (2006). Community Exposure to Perfluorooctanoate: Relationships Between Serum Levels and Certain Health Parameters: *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, *48*(8), 771–779. https://doi.org/10.1097/01.jom.0000233380.13087.37

Endemann, D. H., i Schiffrin, E. L. (2004). Endothelial Dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*, *15*(8), 1983–1992. https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000132474.50966.DA

Eriksson, E. E., Karlof, E., Lundmark, K., Rotzius, P., Hedin, U., i Xie, X. (2005). Powerful Inflammatory Properties of Large Vein Endothelium In Vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *25*(4), 723–728. https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000157578.51417.6f

Espartero J. L., L., Yamada, M., Ford, J., Owens, G., Prow, T., i Juhasz, A. (2022). Health-related toxicity of emerging per- and polyfluoroalkyl substances: Comparison to

legacy PFOS and PFOA. *Environmental Research*, *212*, 113431. https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113431

Fàbrega, F., Kumar, V., Schuhmacher, M., Domingo, J. L., i Nadal, M. (2014). PBPK modeling for PFOS and PFOA: Validation with human experimental data. *Toxicology Letters*, *230*(2), 244–251. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.007

Felmeden, D., Blann, A. D., i Lip, G. Y. H. (2003). Angiogenesis: Basic pathophysiology and implications for disease. *European Heart Journal*, *24*(7), 586–603. https://doi.org/10.1016/S0195-668X(02)00635-8

Ferrara, N. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews*, *25*(4), 581–611. https://doi.org/10.1210/er.2003-0027

Florey. (1966). The Endothelial Cell. *The British Medical Journal*, *2*(5512), 487–490. https://doi.org.10.1136/bmj.2.5512.487

Förstermann, U. (2010). Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *459*(6), 923–939. https://doi.org/10.1007/s00424-010-0808-2

Forstermann, U., i Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*, *33*(7), 829–837. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304

Forsthuber, M., Widhalm, R., Granitzer, S., Kaiser, A. M., Moshammer, H., Hengstschläger, M., Dolznig, H., i Gundacker, C. (2022). Perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) inhibits vessel formation in a human 3D co-culture angiogenesis model (NCFs/HUVECs). *Environmental Pollution*, *293*, 118543. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118543

Foulquier, S., Daskalopoulos, E. P., Lluri, G., Hermans, K. C. M., Deb, A., i Blankesteijn, W. M. (2018). WNT Signaling in Cardiac and Vascular Disease. *Pharmacological Reviews*, *70*(1), 68–141. https://doi.org/10.1124/pr.117.013896

Fragki, S., Louisse, J., Bokkers, B., Luijten, M., Peijnenburg, A., Rijkers, D., Piersma, A. H., i Zeilmaker, M. J. (2023). New approach methodologies: A quantitative in vitro to in vivo extrapolation case study with PFASs. *Food and Chemical Toxicology*, *172*, 113559. https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113559

Frey, R. S., Ushio–Fukai, M., i Malik, A. B. (2009). NADPH Oxidase-Dependent Signaling in Endothelial Cells: Role in Physiology and Pathophysiology. *Antioxidants & Redox Signaling*, *11*(4), 791–810. https://doi.org/10.1089/ars.2008.2220

Fu, J., Gao, Y., Cui, L., Wang, T., Liang, Y., Qu, G., Yuan, B., Wang, Y., Zhang, A., i Jiang, G. (2016). Occurrence, temporal trends, and half-lives of perfluoroalkyl acids

(PFAAs) in occupational workers in China. *Scientific Reports*, *6*(1), 38039. https://doi.org/10.1038/srep38039

Fuller, R., Landrigan, P. J., Balakrishnan, K., Bathan, G., Bose-O'Reilly, S., Brauer, M., Caravanos, J., Chiles, T., Cohen, A., Corra, L., Cropper, M., Ferraro, G., Hanna, J., Hanrahan, D., Hu, H., Hunter, D., Janata, G., Kupka, R., Lanphear, B., … Yan, C. (2022). Pollution and health: A progress update. *The Lancet Planetary Health*, *6*(6), e535–e547. https://doi.org/10.1016/S2542-5196(22)00090-0

Gaborit, N., Sakuma, R., Wylie, J. N., Kim, K.-H., Zhang, S.-S., Hui, C.-C., i Bruneau, B. G. (2012). Cooperative and antagonistic roles for Irx3 and Irx5 in cardiac morphogenesis and postnatal physiology. *Development*, *139*(21), 4007–4019. https://doi.org/10.1242/dev.081703

Galley, H. F., i Webster, N. R. (2004). Physiology of the endothelium. *British Journal of Anaesthesia*, *93*(1), 105–113. https://doi.org/10.1093/bja/aeh163

Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Duggleby, R. G., Windmill, K. F., Martin, J. L., i McManus, M. E. (2006). Human Sulfotransferases and Their Role in Chemical Metabolism. *Toxicological Sciences*, *90*(1), 5–22. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj061

Gannon, A. M., Moreau, M., Farmahin, R., Thomas, R. S., Barton-Maclaren, T. S., Nong, A., Curran, I., i Yauk, C. L. (2019). Hexabromocyclododecane (HBCD): A case study applying tiered testing for human health risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, *131*, 110581. https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110581

Gasparrini, A., Guo, Y., Hashizume, M., Lavigne, E., Zanobetti, A., Schwartz, J., Tobias, A., Tong, S., Rocklöv, J., Forsberg, B., Leone, M., De Sario, M., Bell, M. L., Guo, Y.-L. L., Wu, C., Kan, H., Yi, S.-M., De Sousa Zanotti Stagliorio Coelho, M., Saldiva, P. H. N., … Armstrong, B. (2015). Mortality risk attributable to high and low ambient temperature: A multicountry observational study. *The Lancet*, *386*(9991), 369–375. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62114-0

Geiger, S. D., Yao, P., Vaughn, M. G., i Qian, Z. (2021). PFAS exposure and overweight/obesity among children in a nationally representative sample. *Chemosphere*, *268*, 128852. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128852

Gimbrone, M. A., i García-Cardeña, G. (2016). Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation Research*, *118*(4), 620–636. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301

Glüge, J., Scheringer, M., Cousins, I. T., DeWitt, J. C., Goldenman, G., Herzke, D., Lohmann, R., Ng, C. A., Trier, X., i Wang, Z. (2020). An overview of the uses of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS). *Environmental Science: Processes & Impacts*, *22*(12), 2345–2373. https://doi.org/10.1039/D0EM00291G

Golias, C., Tsoutsi, E., Matziridis, A., Makridis, P., Batistatou, A., i Charalabopoulos, K. (2007). *Review. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease*. *21*(5), 757–769.

Gonella, A., Giacomello, M., Finos, L., i Peruffo, A. (2025). Exposure to PFOS, PFBS, PFOA and PFBA impairs cell cycle progression in bovine brain (Bos taurus) endothelial cells. *Research in Veterinary Science*, *187*, 105585. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2025.105585

Góralczyk, K., Pachocki, K. A., Hernik, A., Struciński, P., Czaja, K., Lindh, C. H., Jönsson, B. A. G., Lenters, V., Korcz, W., Minorczyk, M., Matuszak, M., i Ludwicki, J. K. (2015). Perfluorinated chemicals in blood serum of inhabitants in central Poland in relation to gender and age. *Science of The Total Environment*, *532*, 548–555. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.050

Grandjean, P., Andersen, E. W., Budtz-Jørgensen, E., Nielsen, F., Mølbak, K., Weihe, P., i Heilmann, C. (2012). Serum Vaccine Antibody Concentrations in Children Exposed to Perfluorinated Compounds. *JAMA*, *307*(4). https://doi.org/10.1001/jama.2011.2034

Gützkow, K. B., Haug, L. S., Thomsen, C., Sabaredzovic, A., Becher, G., i Brunborg, G. (2012). Placental transfer of perfluorinated compounds is selective – A Norwegian Mother and Child sub-cohort study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *215*(2), 216–219. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.011

Hamadeh, H. K., Bushel, P. R., Jayadev, S., Martin, K., DiSorbo, O., Sieber, S., Bennett L., Tennant, R., Stoll, R., Barrett, J. C., Blanchard, K., Paules, R. S., i Afshari, C. A. (2002). Gene Expression Analysis Reveals Chemical-Specific Profiles. *Toxicological Sciences*, *67*(2), 219–231. https://doi.org/10.1093/toxsci/67.2.219

Han, X., Nabb, D. L., Russell, M. H., Kennedy, G. L., i Rickard, R. W. (2012). Renal Elimination of Perfluorocarboxylates (PFCAs). *Chemical Research in Toxicology*, *25*(1), 35–46. https://doi.org/10.1021/tx200363w

Happel, J., Mellouk, N., Crute, C., i Feng, L. (2025). PFBS disrupts lipid metabolism and mitochondrial function in human trophoblast cells. *Toxicology*, *518*, 154269. https://doi.org/10.1016/j.tox.2025.154269

Harada, K., Inoue, K., Morikawa, A., Yoshinaga, T., Saito, N., i Koizumi, A. (2005). Renal clearance of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in humans and their species-specific excretion. *Environmental Research*, *99*(2), 253–261. https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.12.003

Harrill, J., Shah, I., Setzer, R. W., Haggard, D., Auerbach, S., Judson, R., i Thomas, R. S. (2019). Considerations for strategic use of high-throughput transcriptomics chemical screening data in regulatory decisions. *Current Opinion in Toxicology*, *15*, 64–75. https://doi.org/10.1016/j.cotox.2019.05.004

Hartmann, C., Kaiser, A.-M., Moche, W., Weiss, S., Raffesberg, W., Scharf, S., Graf-Rohrmeister, K., Thanhaeuser, M., Haiden, N., i Uhl, M. (2024). Persistent Organic Pollutants in Austrian Human Breast Milk Collected between 2013 and 2016. *Journal of Xenobiotics*, *14*(1), 247–266. https://doi.org/10.3390/jox14010015

Herrmann, J., Lerman, L. O., Mukhopadhyay, D., Napoli, C., i Lerman, A. (2006). Angiogenesis in Atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *26*(9), 1948–1957. https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000233387.90257.9b

Hida, K., Maishi, N., Annan, D., i Hida, Y. (2018). Contribution of Tumor Endothelial Cells in Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(5), 1272. https://doi.org/10.3390/ijms19051272

Hofmann, A., S. Mishra, J., Yadav, P., Dangudubiyyam, S. V., S. Blesson, C., i Kumar, S. (2023). PFOS Impairs Mitochondrial Biogenesis and Dynamics and Reduces Oxygen Consumption in Human Trophoblasts. *Journal of Environmental Science and Public Health*, *07*(04). https://doi.org/10.26502/jesph.96120197

Hsu, J.-Y., Hsu, J.-F., Ho, H.-H., Chiang, C.-F., i Liao, P.-C. (2013). Background levels of Persistent Organic Pollutants in humans from Taiwan: Perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid. *Chemosphere*, *93*(3), 532–537. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.047

Hu, X.-Z., i Hu, D.-C. (2009). Effects of perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate exposure on hepatoma Hep G2 cells. *Archives of Toxicology*, *83*(9), 851–861. https://doi.org/10.1007/s00204-009-0441-z

Huang, M., Jiao, J., Zhuang, P., Chen, X., Wang, J., i Zhang, Y. (2018). Serum polyfluoroalkyl chemicals are associated with risk of cardiovascular diseases in national US population. *Environment International*, *119*, 37–46. https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.05.051

Huang, Q., Fang, C., Wu, X., Fan, J., i Dong, S. (2011). Perfluorooctane sulfonate impairs the cardiac development of a marine medaka (Oryzias melastigma). *Aquatic Toxicology*, *105*(1–2), 71–77. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.05.012

Hulpiau, P., i Van Roy, F. (2009). Molecular evolution of the cadherin superfamily. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *41*(2), 349–369. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.09.027

Hussey, M. R., Kornberg, T. G., Sherrick, J. M., Olson, A. M., Kind, J. A., i Perez, A. L. (2025). The relationship between PFAS exposure and dyslipidemia: An updated review, meta-analysis, and evaluation of bias. *European Journal of Epidemiology*, *40*(9), 995–1029. https://doi.org/10.1007/s10654-025-01271-4

Incalza, M. A., D'Oria, R., Natalicchio, A., Perrini, S., Laviola, L., i Giorgino, F. (2018). Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascular Pharmacology*, *100*, 1–19. https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.05.005

Ingelido, A. M., Abballe, A., Dellatte, E., Ferri, F., Iacovella, N., Marra, V., Valentini, S., i De Felip, E. (2025). Ten years of PFOS and PFOA human biomonitoring in Italy: Exposure levels and determinants of exposure. *Chemosphere*, *376*, 144297. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2025.144297

Jensen, A. A., i Leffers, H. (2008). Emerging endocrine disrupters: Perfluoroalkylated substances. *International Journal of Andrology*, *31*(2), 161–169. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2008.00870.x

Ji, C., Pavuk, M., i Ruiz, P. (2025). Global Serum Per- and Polyfluoroalkyl Substances Exposures and Their Correlation with Lipids: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Environmental Science & Technology*, *59*(37), 19611–19629. https://doi.org/10.1021/acs.est.5c02675

Jiang, Q., Lust, R. M., Strynar, M. J., Dagnino, S., i DeWitt, J. C. (2012). Perfluorooctanoic acid induces developmental cardiotoxicity in chicken embryos and hatchlings. *Toxicology*, *293*(1–3), 97–106. https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.01.005

Jones, H., i Rowland-Yeo, K. (2013). Basic Concepts in Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling in Drug Discovery and Development. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, *2*(8), 1–12. https://doi.org/10.1038/psp.2013.41

Judson, R. S., Kavlock, R. J., Setzer, R. W., Cohen Hubal, E. A., Martin, M. T., Knudsen, T. B., Houck, K. A., Thomas, R. S., Wetmore, B. A., i Dix, D. J. (2011). Estimating

Toxicity-Related Biological Pathway Altering Doses for High-Throughput Chemical Risk Assessment. *Chemical Research in Toxicology*, *24*(4), 451–462. https://doi.org/10.1021/tx100428e

Kabakci, R., Clark, K. L., Plewes, M. R., Monaco, C. F., i Davis, J. S. (2023). Perfluorooctanoic acid (PFOA) inhibits steroidogenesis and mitochondrial function in bovine granulosa cells in vitro. *Environmental Pollution*, *338*, 122698. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122698

Kabir, E. R., Rahman, M. S., i Rahman, I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *40*(1), 241–258. https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009

Kanetani, K., Nakamura, K., Harada, K. H., Akihisa, H., Oshima, T., Ogata, H., i Koizumi, A. (2025). High serum perfluorooctanoic acid (PFOA) concentrations and interstitial lung disease in former and current workers in a fluorochemical company. *Industrial Health*, *63*(5), 490–502. https://doi.org/10.2486/indhealth.2025-0009

Kania, A., i Klein, R. (2016). Mechanisms of ephrin–Eph signalling in development, physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(4), 240–256. https://doi.org/10.1038/nrm.2015.16

Kärrman, A., Ericson, I., Van Bavel, B., Darnerud, P. O., Aune, M., Glynn, A., Lignell, S., i Lindström, G. (2007). Exposure of Perfluorinated Chemicals through Lactation: Levels of Matched Human Milk and Serum and a Temporal Trend, 1996–2004, in Sweden. *Environmental Health Perspectives*, *115*(2), 226–230. https://doi.org/10.1289/ehp.9491

Kataria, A., Trachtman, H., Malaga-Dieguez, L., i Trasande, L. (2015). Association between perfluoroalkyl acids and kidney function in a cross-sectional study of adolescents. *Environmental Health*, *14*(1), 89. https://doi.org/10.1186/s12940-015-0077-9

Kim, S., Thapar, I., i Brooks, B. W. (2021). Epigenetic changes by per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS). *Environmental Pollution*, *279*, 116929. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116929

Kleszczyński, K., Gardzielewski, P., Mulkiewicz, E., Stepnowski, P., i Składanowski, A. C. (2007). Analysis of structure–cytotoxicity in vitro relationship (SAR) for perfluorinated carboxylic acids. *Toxicology in Vitro*, *21*(6), 1206–1211. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.04.020

Koenig, M. N., Naik, E., Rohrbeck, L., Herold, M. J., Trounson, E., Bouillet, P., Thomas, T., Voss, A. K., Strasser, A., i Coultas, L. (2014). Pro-apoptotic BIM is an essential

initiator of physiological endothelial cell death independent of regulation by FOXO3. *Cell Death & Differentiation*, *21*(11), 1687–1695. https://doi.org/10.1038/cdd.2014.90

Koleti, A., Terryn, R., Stathias, V., Chung, C., Cooper, D. J., Turner, J. P., Vidović, D., Forlin, M., Kelley, T. T., D'Urso, A., Allen, B. K., Torre, D., Jagodnik, K. M., Wang, L., Jenkins, S. L., Mader, C., Niu, W., Fazel, M., Mahi, N., … Schürer, S. C. (2018). Data Portal for the Library of Integrated Network-based Cellular Signatures (LINCS) program: Integrated access to diverse large-scale cellular perturbation response data. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D558–D566. https://doi.org/10.1093/nar/gkx1063

Komarova, Y., i Malik, A. B. (2010). Regulation of Endothelial Permeability via Paracellular and Transcellular Transport Pathways. *Annual Review of Physiology*, *72*(1), 463–493. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135833

Koskela, A., Koponen, J., Lehenkari, P., Viluksela, M., Korkalainen, M., i Tuukkanen, J. (2017). Perfluoroalkyl substances in human bone: Concentrations in bones and effects on bone cell differentiation. *Scientific Reports*, *7*(1), 6841. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07359-6

Kotlinowski, J., i Jozkowicz, A. (2016). PPAR Gamma and Angiogenesis: Endothelial Cells Perspective. *Journal of Diabetes Research*, *2016*, 1–11. https://doi.org/10.1155/2016/8492353

Krämer, A., Green, J., Pollard, J., i Tugendreich, S. (2014). Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics*, *30*(4), 523–530. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt703

Krewski, D., Acosta, D., Andersen, M., Anderson, H., Bailar, J. C., Boekelheide, K., Brent, R., Charnley, G., Cheung, V. G., Green, S., Kelsey, K. T., Kerkvliet, N. I., Li, A. A., McCray, L., Meyer, O., Patterson, R. D., Pennie, W., Scala, R. A., Solomon, G. M., … Staff Of Committee On Toxicity Testing And Assessment Of Env. (2010). Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, *13*(2–4), 51–138. https://doi.org/10.1080/10937404.2010.483176

Krewski, D., Andersen, M. E., Tyshenko, M. G., Krishnan, K., Hartung, T., Boekelheide, K., Wambaugh, J. F., Jones, D., Whelan, M., Thomas, R., Yauk, C., Barton-Maclaren, T., i Cote, I. (2020). Toxicity testing in the 21st century: Progress in the past decade and future perspectives. *Archives of Toxicology*, *94*(1), 1–58. https://doi.org/10.1007/s00204-019-02613-4

Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R.-P., i Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(18), 4411. https://doi.org/10.3390/ijms20184411

Kubes, P., Suzuki, M., i Granger, D. N. (1991). Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(11), 4651–4655. https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4651

Kubra, K., i Barabutis, N. (2022). P53 in endothelial function and unfolded protein response regulation. *Cell Biology International*, *46*(12), 2257–2261. https://doi.org/10.1002/cbin.11891

Lagarde, F., Beausoleil, C., Belcher, S. M., Belzunces, L. P., Emond, C., Guerbet, M., i Rousselle, C. (2015). Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: A qualitative method of assessment. *Environmental Health*, *14*(1), 13. https://doi.org/10.1186/1476-069X-14-13

Lamalice, L., Le Boeuf, F., i Huot, J. (2007). Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. *Circulation Research*, *100*(6), 782–794. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e

Lamb, J., Crawford, E. D., Peck, D., Modell, J. W., Blat, I. C., Wrobel, M. J., Lerner, J., Brunet, J.-P., Subramanian, A., Ross, K. N., Reich, M., Hieronymus, H., Wei, G., Armstrong, S. A., Haggarty, S. J., Clemons, P. A., Wei, R., Carr, S. A., Lander, E. S., i Golub, T. R. (2006). The Connectivity Map: Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes, and Disease. *Science*, *313*(5795), 1929–1935. https://doi.org/10.1126/science.1132939

Lechner, K., Von Schacky, C., McKenzie, A. L., Worm, N., Nixdorff, U., Lechner, B., Kränkel, N., Halle, M., Krauss, R. M., i Scherr, J. (2020). Lifestyle factors and high-risk atherosclerosis: Pathways and mechanisms beyond traditional risk factors. *European Journal of Preventive Cardiology*, *27*(4), 394–406. https://doi.org/10.1177/2047487319869400

Lee, H. J., Hong, Y. J., i Kim, M. (2021). Angiogenesis in Chronic Inflammatory Skin Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(21), 12035. https://doi.org/10.3390/ijms222112035

Lemoine, A. Y., Ledoux, S., i Larger, E. (2013). Adipose tissue angiogenesis in obesity. *Thrombosis and Haemostasis*, *110*(10), 661–669. https://doi.org/10.1160/TH13-01-0073

Leung, Y.-K., Biesiada, J., Govindarajah, V., Ying, J., Kendler, A., Medvedovic, M., i Ho, S.-M. (2020). Low-Dose Bisphenol A in a Rat Model of Endometrial Cancer: A CLARITY-BPA Study. *Environmental Health Perspectives*, *128*(12), 127005. https://doi.org/10.1289/EHP6875

Levick, J. R., i Smaje, L. H. (1987). An analysis of the permeability of a fenestra. *Microvascular Research*, *33*(2), 233–256. https://doi.org/10.1016/0026-2862(87)90020-3

Levine, A. J. (2020). p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nature Reviews Cancer*, *20*(8), 471–480. https://doi.org/10.1038/s41568-020-0262-1

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., i Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, *7*(9), 678–689. https://doi.org/10.1038/nri2156

Li, H., Chen, J., Jingchao Lu, Yang, J., Tan, Z., Li, L., Xiao, F., An, Z., Ma, C., Liu, Y., Wang, L., Zhang, X., i Guo, H. (2023). Association of exposure to perfluoroalkyl substances and risk of the acute coronary syndrome: A case-control study in Shijiazhuang Hebei Province. *Chemosphere*, *313*, 137464. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137464

Li, H., Zhang, M., Vervoort, J., Rietjens, I. M. C. M., Van Ravenzwaay, B., i Louisse, J. (2017). Use of physiologically based kinetic modeling-facilitated reverse dosimetry of in vitro toxicity data for prediction of in vivo developmental toxicity of tebuconazole in rats. *Toxicology Letters*, *266*, 85–93. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.11.017

Li, J., Quan, X., Lei, S., Huang, Z., Wang, Q., i Xu, P. (2021). PFOS Inhibited Normal Functional Development of Placenta Cells via PPARγ Signaling. *Biomedicines*, *9*(6), 677. https://doi.org/10.3390/biomedicines9060677

Li, L., Zhai, Z., Liu, J., i Hu, J. (2015). Estimating industrial and domestic environmental releases of perfluorooctanoic acid and its salts in China from 2004 to 2012. *Chemosphere*, *129*, 100–109. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.11.049

Li, Y., Barregard, L., Xu, Y., Scott, K., Pineda, D., Lindh, C. H., Jakobsson, K., i Fletcher, T. (2020). Associations between perfluoroalkyl substances and serum lipids in a Swedish adult population with contaminated drinking water. *Environmental Health*, *19*(1), 33. https://doi.org/10.1186/s12940-020-00588-9

Li, Y., Fletcher, T., Mucs, D., Scott, K., Lindh, C. H., Tallving, P., i Jakobsson, K. (2018). Half-lives of PFOS, PFHxS and PFOA after end of exposure to contaminated

drinking water. *Occupational and Environmental Medicine*, *75*(1), 46–51. https://doi.org/10.1136/oemed-2017-104651

Li, Z., Zhang, Z., Zhang, B., Zhou, C., Yu, H., Xu, L., He, Z., Chen, P., Peng, W., Ye, M., Qu, G., Zhang, X., Song, Y., Jin, X., i Zheng, Y. (2025). Perfluorinated compounds exposure and atherogenic risk characteristics in a high-fat diet condition: In vitro/in vivo models and population panel study. *PNAS Nexus*, *4*(5), pgaf153. https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgaf153

Liang, L., Pan, Y., Bin, L., Liu, Y., Huang, W., Li, R., i Lai, K. P. (2022). Immunotoxicity mechanisms of perfluorinated compounds PFOA and PFOS. *Chemosphere*, *291*, 132892. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132892

Liang, P., Xie, W., Wang, X., Du, Z., Zheng, C., Zhao, H., Wang, Z., i Ji, Z. (2024). Ischemia-inhibited ferric chelate reductase 1 improves ferroptosis-mediated intestinal ischemia injury via Hippo signaling. *International Immunopharmacology*, *132*, 111900. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.111900

Liao, Y., Wang, J., Huang, Q., Fang, C., Kiyama, R., Shen, H., i Dong, S. (2012). Evaluation of cellular response to perfluorooctane sulfonate in human umbilical vein endothelial cells. *Toxicology in Vitro*, *26*(3), 421–428. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.01.011

Lin, C. Y., Lin, L. Y., Wen, T. W., Lien, G. W., Chien, K. L., Hsu, S. H. J., Liao, C. C., Sung, F. C., Chen, P. C., i Su, T. C. (2013). Association between levels of serum perfluorooctane sulfate and carotid artery intima–media thickness in adolescents and young adults. *International Journal of Cardiology*, *168*(4), 3309–3316. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.04.042

Lin, Y. J., i Lin, Z. (2020). In vitro-in silico-based probabilistic risk assessment of combined exposure to bisphenol A and its analogues by integrating ToxCast high-throughput in vitro assays with in vitro to in vivo extrapolation (IVIVE) via physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling. *Journal of Hazardous Materials*, *399*, 122856. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122856

Lindstrom, A. B., Strynar, M. J., i Libelo, E. L. (2011). Polyfluorinated Compounds: Past, Present, and Future. *Environmental Science & Technology*, *45*(19), 7954–7961. https://doi.org/10.1021/es2011622

Liu, D., Yan, S., Wang, P., Chen, Q., Liu, Y., Cui, J., Liang, Y., Ren, S., i Gao, Y. (2023). Perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure in relation to the kidneys: A review of current available literature. *Frontiers in Physiology*, *14*, 1103141. https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1103141

Liu, Q. S., Hao, F., Sun, Z., Long, Y., Zhou, Q., i Jiang, G. (2018). Perfluorohexadecanoic acid increases paracellular permeability in endothelial cells through the activation of plasma kallikrein-kinin system. *Chemosphere*, *190*, 191–200. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.002

Liu, X., Chen, R., Peng, Y., Zhou, Y., Xia, M., Wu, X., Wang, Y., Yin, W., Han, Y., i Yu, M. (2024). Perfluorooctanoic acid (PFOA) induces cardiotoxicity by activating the Keap1/Nrf2 pathway in zebrafish (Danio rerio) embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *285*, 117098. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.117098

Liu, Y. J., Du, J., Li, J., Tan, X. P., i Zhang, Q. (2023). CTHRC1, a novel gene with multiple functions in physiology, disease and solid tumors (Review). *Oncology Letters*, *25*(6), 266. https://doi.org/10.3892/ol.2023.13852

Liu, Y. Z., Yang, K., Zhang, W., Zhang, Q., Liu, T. F., Xu, T., Li, Y., Ran, R. X., Yang, K., Cao, Y. F., i Fang, Z. Z. (2023). Inhibition of human sulfotransferases (SULTs) by per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) and structure-activity relationship. *Food and Chemical Toxicology*, *174*, 113664. https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113664

Loccisano, A. E., Campbell, J. L., Andersen, M. E., i Clewell, H. J. (2011). Evaluation and prediction of pharmacokinetics of PFOA and PFOS in the monkey and human using a PBPK model. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *59*(1), 157–175. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.12.004

Loccisano, A. E., Longnecker, M. P., Campbell, J. L., Andersen, M. E., i Clewell, H. J. (2013). Development of Pbpk Models for Pfoa and Pfos for Human Pregnancy and Lactation Life Stages. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, *76*(1), 25–57. https://doi.org/10.1080/15287394.2012.722523

López-Vázquez, J., Montes, R., Rodil, R., Cela, R., Martínez-Pontevedra, J. Á., Pena, M. T., i Quintana, J. B. (2024). Determination of regulated perfluoroalkyl substances (PFAS) in drinking water according to Directive 2020/2184/EU. *Environmental Science and Pollution Research*. https://doi.org/10.1007/s11356-024-34852-z

Ma, Q. (2013). Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *53*(1), 401–426. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320

Maeda, H., Nakamura, H., i Fang, J. (2013). The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic

toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *65*(1), 71–79. https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.002

Majewska, A., Wilkus, K., Brodaczewska, K., i Kieda, C. (2021). Endothelial Cells as Tools to Model Tissue Microenvironment in Hypoxia-Dependent Pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), 520. https://doi.org/10.3390/ijms22020520

Mamsen, L. S., Jönsson, B. A. G., Lindh, C. H., Olesen, R. H., Larsen, A., Ernst, E., Kelsey, T. W., i Andersen, C. Y. (2017). Concentration of perfluorinated compounds and cotinine in human foetal organs, placenta, and maternal plasma. *Science of The Total Environment*, *596–597*, 97–105. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.058

Maranhao Neto, G. A., Polcrova, A. B., Pospisilova, A., Blaha, L., Klanova, J., Bobak, M., i Gonzalez-Rivas, J. P. (2022). Associations between Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) and Cardiometabolic Biomarkers in Adults of Czechia: The Kardiovize Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(21), 13898. https://doi.org/10.3390/ijerph192113898

Matteo, G., Leingartner, K., Rowan-Carroll, A., Meier, M., Williams, A., Beal, M. A., Gagné, M., Farmahin, R., Wickramasuriya, S., Reardon, A. J. F., Barton-Maclaren, T., Christopher Corton, J., Yauk, C. L., i Atlas, E. (2023). *In vitro* transcriptomic analyses reveal pathway perturbations, estrogenic activities, and potencies of data-poor BPA alternative chemicals. *Toxicological Sciences*, *191*(2), 266–275. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfac127

Mehta, D., i Malik, A. B. (2006). Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Physiological Reviews*, *86*(1), 279–367. https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2005

Miao, G., Zhou, C., Xu, L., Zhao, L., Zhang, J., Zhang, Z., Kou, Z., Ahmed, R. Z., Lu, D., Jin, X., i Zheng, Y. (2025). Evaluating the Vascular Risk of PFCs: An Integrated XGBoost-Driven Structure–Activity Prediction and Experimental Validation Study. *Environment & Health*, *3*(7), 795–806. https://doi.org/10.1021/envhealth.5c00014

Michel, C. C., i Curry, F. E. (1999). Microvascular Permeability. *Physiological Reviews*, *79*(3), 703–761. https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.3.703

Michel, J. B., Delbosc, S., Ho-Tin-Noé, B., Leseche, G., Nicoletti, A., Meilhac, O., i Martin-Ventura, J. L. (2012). From intraplaque haemorrhages to plaque vulnerability: Biological consequences of intraplaque haemorrhages. *Journal of Cardiovascular Medicine*, *13*(10), 628–634. https://doi.org/10.2459/JCM.0b013e328357face

Michel, T., i Vanhoutte, P. M. (2010). Cellular signaling and NO production. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *459*(6), 807–816. https://doi.org/10.1007/s00424-009-0765-9

Min, J. Y., Lee, K. J., Park, J. B., i Min, K. B. (2012). Perfluorooctanoic acid exposure is associated with elevated homocysteine and hypertension in US adults. *Occupational and Environmental Medicine*, *69*(9), 658–662. https://doi.org/10.1136/oemed-2011-100288

Miralles-Marco, A., i Harrad, S. (2015). Perfluorooctane sulfonate: A review of human exposure, biomonitoring and the environmental forensics utility of its chirality and isomer distribution. *Environment International*, *77*, 148–159. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.02.002

Mokra, K. (2021). Endocrine Disruptor Potential of Short- and Long-Chain Perfluoroalkyl Substances (PFASs)—A Synthesis of Current Knowledge with Proposal of Molecular Mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4), 2148. https://doi.org/10.3390/ijms22042148

Moncada, S., i Higgs, A. (1993). The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *New England Journal of Medicine*, *329*(27), 2002–2012. https://doi.org/10.1056/NEJM199312303292706

Moulton, K. S. (2006). Angiogenesis in atherosclerosis: Gathering evidence beyond speculation. *Current Opinion in Lipidology*, *17*(5), 548–555. https://doi.org/10.1097/01.mol.0000245261.71129.f0

Mishra, S. J., i Kumar, S. (2023). Whole-Genome Transcriptome Profiling in PFOS-treated Uterine Artery Endothelial Cells Isolated from Pregnant Women. *Journal of Environmental Science and Public Health*, *07*(02). https://doi.org/10.26502/jesph.96120189

Muir, D., Bossi, R., Carlsson, P., Evans, M., De Silva, A., Halsall, C., Rauert, C., Herzke, D., Hung, H., Letcher, R., Rigét, F., i Roos, A. (2019). Levels and trends of poly- and perfluoroalkyl substances in the Arctic environment – An update. *Emerging Contaminants*, *5*, 240–271. https://doi.org/10.1016/j.emcon.2019.06.002

Muller, W. A. (2011). Mechanisms of Leukocyte Transendothelial Migration. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *6*(1), 323–344. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130224

Münzel, T., Schmidt, F. P., Steven, S., Herzog, J., Daiber, A., i Sørensen, M. (2018). Environmental Noise and the Cardiovascular System. *Journal of the American College of Cardiology*, *71*(6), 688–697. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.12.015

Münzel, T., Sørensen, M., i Daiber, A. (2021). Transportation noise pollution and cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, *18*(9), 619–636. https://doi.org/10.1038/s41569-021-00532-5

Murase, W., Kubota, A., Ikeda-Araki, A., Terasaki, M., Nakagawa, K., Shizu, R., Yoshinari, K., i Kojima, H. (2023). Effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) on gene expression profiles via nuclear receptors in HepaRG cells: Comparative study with in vitro transactivation assays. *Toxicology*, *494*, 153577. https://doi.org/10.1016/j.tox.2023.153577

Musa, A., Ghoraie, L. S., Zhang, S. D., Galzko, G., Yli-Harja, O., Dehmer, M., Haibe-Kains, B., i Emmert-Streib, F. (2017). A review of connectivity map and computational approaches in pharmacogenomics. *Briefings in Bioinformatics*, bbw112. https://doi.org/10.1093/bib/bbw112

Nelson, J. W., Hatch, E. E., i Webster, T. F. (2010). Exposure to Polyfluoroalkyl Chemicals and Cholesterol, Body Weight, and Insulin Resistance in the General U.S. Population. *Environmental Health Perspectives*, *118*(2), 197–202. https://doi.org/10.1289/ehp.0901165

Ng, H. Y., Lee, K. X. A., Kuo, C. N., i Shen, Y. F. (2018). Bioprinting of artificial blood vessels. *International Journal of Bioprinting*, *4*(2), 140. https://doi.org/10.18063/ijb.v4i2.140

Nie, X., Liu, C., Guo, Q., Zheng, M., Gao, L., Li, X., Liu, D., Zhu, L., Liu, J., i Lin, B. (2019). TMEFF1 overexpression and its mechanism for tumor promotion in ovarian cancer. *Cancer Management and Research*, *Volume 11*, 839–855. https://doi.org/10.2147/CMAR.S186080

Nielsen, F., Fischer, F. C., Leth, P. M., i Grandjean, P. (2024). Occurrence of Major Perfluorinated Alkylate Substances in Human Blood and Target Organs. *Environmental Science & Technology*, *58*(1), 143–149. https://doi.org/10.1021/acs.est.3c06499

Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., i Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5–deficient mice. *The Journal of Cell Biology*, *161*(3), 653–660. https://doi.org/10.1083/jcb.200302070

Niu, S., Cao, Y., Chen, R., Bedi, M., Sanders, A. P., Ducatman, A., i Ng, C. (2023). A State-of-the-Science Review of Interactions of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) with Renal Transporters in Health and Disease: Implications for Population Variability in PFAS Toxicokinetics. *Environmental Health Perspectives*, *131*(7), 076002. https://doi.org/10.1289/EHP11885

Nourshargh, S., i Alon, R. (2014). Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity*, *41*(5), 694–707. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008

Nouspikel, T. (2009). DNA Repair in Mammalian Cells: Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *66*(6), 994–1009. https://doi.org/10.1007/s00018-009-8737-y

Obayashi, K., Saeki, K., Iwamoto, J., Okamoto, N., Tomioka, K., Nezu, S., Ikada, Y., i Kurumatani, N. (2013). Exposure to Light at Night, Nocturnal Urinary Melatonin Excretion, and Obesity/Dyslipidemia in the Elderly: A Cross-Sectional Analysis of the HEIJO-KYO Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *98*(1), 337–344. https://doi.org/10.1210/jc.2012-2874

OECD. (2018). *Summary report on the new comprehensive global database of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs)*. OECD. https://doi.org/10.1787/1a14ad6c-en

Ojo, A. F., Peng, C., i Ng, J. C. (2022). Combined effects of mixed per- and polyfluoroalkyl substances on the Nrf2-ARE pathway in ARE reporter-HepG2 cells. *Journal of Hazardous Materials*, *421*, 126827. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126827

Olsen, G. W., Burris, J. M., Ehresman, D. J., Froehlich, J. W., Seacat, A. M., Butenhoff, J. L., i Zobel, L. R. (2007). Half-Life of Serum Elimination of Perfluorooctanesulfonate, Perfluorohexanesulfonate, and Perfluorooctanoate in Retired Fluorochemical Production Workers. *Environmental Health Perspectives*, *115*(9), 1298–1305. https://doi.org/10.1289/ehp.10009

Olsen, G. W., Burris, J. M., Mandel, J. H., i Zobel, L. R. (1999). Serum Perfluorooctane Sulfonate and Hepatic and Lipid Clinical Chemistry Tests in Fluorochemical Production Employees: *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, *41*(9), 799–806. https://doi.org/10.1097/00043764-199909000-00012

Opacic, M., Todorovic, N., Lalic-Popovic, M., Stanic, B., i Andric, N. (2025). Advancing probabilistic risk assessment of perfluorooctanoic acid through integration of in vitro data and physiologically based toxicokinetic modeling coupled with population-specific analysis. *Journal of Hazardous Materials*, *496*, 139402. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.139402

O'Sullivan Bakshi, S., Dakin, Z., Monaghan, M., i Van Gerwen, M. (2025). Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in the United States: Current knowledge and regulatory context. *Science of The Total Environment*, *1003*, 180711. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2025.180711

Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., i Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, *327*(6122), 524–526. https://doi.org/10.1038/327524a0

Pan, J., Ouyang, C., Zhou, S., Wang, X., Liu, H., Zhang, J., Wang, X., Shi, X., Yang, A., i Hu, X. (2024). Temporal Trend of Serum Perfluorooctanoic Acid and Perfluorooctane Sulfonic Acid among U.S. Adults with or without Comorbidities in NHANES 1999–2018. *Toxics*, *12*(5), 314. https://doi.org/10.3390/toxics12050314

Papapetropoulos, A., García-Cardeña, G., Madri, J. A., i Sessa, W. C. (1997). Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, *100*(12), 3131–3139. https://doi.org/10.1172/JCI119868

Pappenheimer, J. R. (1953). Passage of Molecules Through Capillary Walls. *Physiological Reviews*, *33*(3), 387–423. https://doi.org/10.1152/physrev.1953.33.3.387

Park, S. K., Ding, N., i Han, D. (2021). Perfluoroalkyl substances and cognitive function in older adults: Should we consider non-monotonic dose-responses and chronic kidney disease? *Environmental Research*, *192*, 110346. https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110346

Pérez, F., Nadal, M., Navarro-Ortega, A., Fàbrega, F., Domingo, J. L., Barceló, D., i Farré, M. (2013). Accumulation of perfluoroalkyl substances in human tissues. *Environment International*, *59*, 354–362. https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.004

Petersen, K. U., Lauritzen, D. F., Wils, R. S., Saber, A. T., Vogel, U., Ebbehøj, N. E., Hansen, J., Pedersen, J. E., Jensen, T. K., i Guerra Andersen, M. H. (2025). Serum concentrations of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) among men from the Danish fire services and Armed Forces. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *267*, 114559. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2025.114559

Phillips, J. R., Svoboda, D. L., Tandon, A., Patel, S., Sedykh, A., Mav, D., Kuo, B., Yauk, C. L., Yang, L., Thomas, R. S., Gift, J. S., Davis, J. A., Olszyk, L., Merrick, B. A., Paules, R. S., Parham, F., Saddler, T., Shah, R. R., i Auerbach, S. S. (2019).

BMDExpress 2: Enhanced transcriptomic dose-response analysis workflow. *Bioinformatics*, *35*(10), 1780–1782. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty878

Pierozan, P., Cattani, D., i Karlsson, O. (2020). Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) induce epigenetic alterations and promote human breast cell carcinogenesis in vitro. *Archives of Toxicology*, *94*(11), 3893–3906. https://doi.org/10.1007/s00204-020-02848-6

Pierozan, P., i Karlsson, O. (2018). PFOS induces proliferation, cell-cycle progression, and malignant phenotype in human breast epithelial cells. *Archives of Toxicology*, *92*(2), 705–716. https://doi.org/10.1007/s00204-017-2077-8

Pober, J. S., i Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, *7*(10), 803–815. https://doi.org/10.1038/nri2171

Porfirio, K., Yadav, P., Dangudubiyyam, S. V., Hofmann, A., Mishra, J. S., i Kumar, S. (2024). Perfluorooctane Sulfonate Exposure Induces Cardiovascular Dysfunction in Female Rats: Role of Ovaries. *Cardiology and Cardiovascular Medicine*, *08*(03). https://doi.org/10.26502/fccm.92920388

Poston, R. N. (2019). Atherosclerosis: Integration of its pathogenesis as a self-perpetuating propagating inflammation: a review. *Cardiovascular Endocrinology & Metabolism*, *8*(2), 51–61. https://doi.org/10.1097/XCE.0000000000000172

Potente, M., Gerhardt, H., i Carmeliet, P. (2011). Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell*, *146*(6), 873–887. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.039

Poteser, M., Hutter, H. P., Moshammer, H., i Weitensfelder, L. (2020). Perfluoroctanoic acid (PFOA) enhances NOTCH-signaling in an angiogenesis model of placental trophoblast cells. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *229*, 113566. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113566

Prevedouros, K., Cousins, I. T., Buck, R. C., i Korzeniowski, S. H. (2006). Sources, Fate and Transport of Perfluorocarboxylates. *Environmental Science & Technology*, *40*(1), 32–44. https://doi.org/10.1021/es0512475

Qian, Y., Ducatman, A., Ward, R., Leonard, S., Bukowski, V., Lan Guo, N., Shi, X., Vallyathan, V., i Castranova, V. (2010). Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) Induces Reactive Oxygen Species (ROS) Production in Human Microvascular Endothelial Cells: Role in Endothelial Permeability. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, *73*(12), 819–836. https://doi.org/10.1080/15287391003689317

Qiu, L., Qian, Y., Liu, Z., Wang, C., Qu, J., Wang, X., i Wang, S. (2016). Perfluorooctane sulfonate (PFOS) disrupts blood-testis barrier by down-regulating junction proteins

via p38 MAPK/ATF2/MMP9 signaling pathway. *Toxicology*, *373*, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.11.003

Rackham, O., Davies, S. M. K., Shearwood, A. M. J., Hamilton, K. L., Whelan, J., i Filipovska, A. (2009). Pentatricopeptide repeat domain protein 1 lowers the levels of mitochondrial leucine tRNAs in cells. *Nucleic Acids Research*, *37*(17), 5859–5867. https://doi.org/10.1093/nar/gkp627

Radomski, M. W., Palmer, R. M. J., i Moncada, S. (1987). The anti-aggregating properties of vascular endothelium: Interactions between prostacyclin and nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*, *92*(3), 639–646. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1987.tb11367.x

Rajagopalan, S., Al-Kindi, S. G., i Brook, R. D. (2018). Air Pollution and Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, *72*(17), 2054–2070. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.07.099

Rampersad, S. N. (2012). Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors*, *12*(9), 12347–12360. https://doi.org/10.3390/s120912347

Reardon, A. J. F., Rowan-Carroll, A., Ferguson, S. S., Leingartner, K., Gagne, R., Kuo, B., Williams, A., Lorusso, L., Bourdon-Lacombe, J. A., Carrier, R., Moffat, I., Yauk, C. L., i Atlas, E. (2021). Potency Ranking of Per- and Polyfluoroalkyl Substances Using High-Throughput Transcriptomic Analysis of Human Liver Spheroids. *Toxicological Sciences*, *184*(1), 154–169. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfab102

Rebholz, S. L., Jones, T., Herrick, R. L., Xie, C., Calafat, A. M., Pinney, S. M., i Woollett, L. A. (2016). Hypercholesterolemia with consumption of PFOA-laced Western diets is dependent on strain and sex of mice. *Toxicology Reports*, *3*, 46–54. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.11.004

Reinhart-King, C. A. (2008). Chapter 3 Endothelial Cell Adhesion and Migration. U *Methods in Enzymology* (Tom 443, str. 45–64). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)02003-X

Reitsma, S., Slaaf, D. W., Vink, H., Van Zandvoort, M. A. M. J., i Oude Egbrink, M. G. A. (2007). The endothelial glycocalyx: Composition, functions, and visualization. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *454*(3), 345–359. https://doi.org/10.1007/s00424-007-0212-8

Ring, C. L., Pearce, R. G., Setzer, R. W., Wetmore, B. A., i Wambaugh, J. F. (2017). Identifying populations sensitive to environmental chemicals by simulating

toxicokinetic variability. *Environment International*, *106*, 105–118. https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.06.004

Rippe, B., Rosengren, B. I., Carlsson, O., i Venturoli, D. (2002). Transendothelial Transport: The Vesicle Controversy. *Journal of Vascular Research*, *39*(5), 375–390. https://doi.org/10.1159/000064521

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, *386*(6626), 671–674. https://doi.org/10.1038/386671a0

Roberts, W. G., i Palade, G. E. (1995). Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of Cell Science*, *108*(6), 2369–2379. https://doi.org/10.1242/jcs.108.6.2369

Rosato, I., Bonato, T., Fletcher, T., Batzella, E., i Canova, C. (2024). Estimation of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) half-lives in human studies: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Research*, *242*, 117743. https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117743

Rosen, M. B., Schmid, J. E., Das, K. P., Wood, C. R., Zehr, R. D., i Lau, C. (2009). Gene expression profiling in the liver and lung of perfluorooctane sulfonate-exposed mouse fetuses: Comparison to changes induced by exposure to perfluorooctanoic acid. *Reproductive Toxicology*, *27*(3–4), 278–288. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.01.007

Rosen, S. D. (1999). Endothelial Ligands for L-Selectin. *The American Journal of Pathology*, *155*(4), 1013–1020. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65201-7

Rosenberg, R. D., i Aird, W. C. (1999). Vascular-Bed–Specific Hemostasis and Hypercoagulable States. *New England Journal of Medicine*, *340*(20), 1555–1564. https://doi.org/10.1056/NEJM199905203402007

Rosenberger, C. M., Wick, K. D., Zhuo, H., Wu, N., Chen, Y., Kapadia, S. B., Guimaraes, A., Chang, D., Choy, D. F., Chen, H., Peck, M., Sullivan, K. M., Ke, S., Jauregui, A., Leligdowicz, A., Sinha, P., Gomez, A. D., Kangelaris, K. N., Delucchi, K., … Hendrickson, C. M. (2023). Early plasma angiopoietin-2 is prognostic for ARDS and mortality among critically ill patients with sepsis. *Critical Care*, *27*(1), 234. https://doi.org/10.1186/s13054-023-04525-3

Ross, R. (1999). Atherosclerosis—An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine*, *340*(2), 115–126. https://doi.org/10.1056/NEJM199901143400207

Rostgaard, J., i Qvortrup, K. (1997). Electron Microscopic Demonstrations of Filamentous Molecular Sieve Plugs in Capillary Fenestrae. *Microvascular Research*, *53*(1), 1–13. https://doi.org/10.1006/mvre.1996.1987

Rowan-Carroll, A., Reardon, A., Leingartner, K., Gagné, R., Williams, A., Meier, M. J., Kuo, B., Bourdon-Lacombe, J., Moffat, I., Carrier, R., Nong, A., Lorusso, L., Ferguson, S. S., Atlas, E., i Yauk, C. (2021). High-Throughput Transcriptomic Analysis of Human Primary Hepatocyte Spheroids Exposed to Per- and Polyfluoroalkyl Substances as a Platform for Relative Potency Characterization. *Toxicological Sciences*, *181*(2), 199–214. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfab039

Rutkowski, J. M., Davis, K. E., i Scherer, P. E. (2009). Mechanisms of obesity and related pathologies: The macro- and microcirculation of adipose tissue. *The FEBS Journal*, *276*(20), 5738–5746. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07303.x

Schjoldager, K. T. B. G., i Clausen, H. (2012). Site-specific protein O-glycosylation modulates proprotein processing—Deciphering specific functions of the large polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1820*(12), 2079–2094. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.014

Serra, A., Fratello, M., Cattelani, L., Liampa, I., Melagraki, G., Kohonen, P., Nymark, P., Federico, A., Kinaret, P. A. S., Jagiello, K., Ha, M. K., Choi, J.-S., Sanabria, N., Gulumian, M., Puzyn, T., Yoon, T.-H., Sarimveis, H., Grafström, R., Afantitis, A., i Greco, D. (2020). Transcriptomics in Toxicogenomics, Part III: Data Modelling for Risk Assessment. *Nanomaterials*, *10*(4), 708. https://doi.org/10.3390/nano10040708

Sessa, W. C. (2004). eNOS at a glance. *Journal of Cell Science*, *117*(12), 2427–2429. https://doi.org/10.1242/jcs.01165

Shankar, A., Xiao, J., i Ducatman, A. (2012). Perfluorooctanoic Acid and Cardiovascular Disease in US Adults. *Archives of Internal Medicine*, *172*(18), 1397. https://doi.org/10.1001/archinternmed.2012.3393

Shihata, W. A., Michell, D. L., Andrews, K. L., i Chin-Dusting, J. P. F. (2016). Caveolae: A Role in Endothelial Inflammation and Mechanotransduction? *Frontiers in Physiology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00628

Shioda, T., Rosenthal, N. F., Coser, K. R., Suto, M., Phatak, M., Medvedovic, M., Carey, V. J., i Isselbacher, K. J. (2013). Expressomal approach for comprehensive analysis and visualization of ligand sensitivities of xenoestrogen responsive genes. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences, *110*(41), 16508–16513. https://doi.org/10.1073/pnas.1315929110

Simionescu, M., Gafencu, A., i Antohe, F. (2002). Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells: A cell biological survey. *Microscopy Research and Technique*, *57*(5), 269–288. https://doi.org/10.1002/jemt.10086

Singh, A. V., Chandrasekar, V., Paudel, N., Laux, P., Luch, A., Gemmati, D., Tisato, V., Prabhu, K. S., Uddin, S., i Dakua, S. P. (2023). Integrative toxicogenomics: Advancing precision medicine and toxicology through artificial intelligence and OMICs technology. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *163*, 114784. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114784

Sluimer, J. C., Kolodgie, F. D., Bijnens, A. P. J. J., Maxfield, K., Pacheco, E., Kutys, B., Duimel, H., Frederik, P. M., Van Hinsbergh, V. W. M., Virmani, R., i Daemen, M. J. A. P. (2009). Thin-Walled Microvessels in Human Coronary Atherosclerotic Plaques Show Incomplete Endothelial Junctions. *Journal of the American College of Cardiology*, *53*(17), 1517–1527. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.12.056

Sluiter, T. J., Van Buul, J. D., Huveneers, S., Quax, P. H. A., i De Vries, M. R. (2021). Endothelial Barrier Function and Leukocyte Transmigration in Atherosclerosis. *Biomedicines*, *9*(4), 328. https://doi.org/10.3390/biomedicines9040328

Stanek, A., Fazeli, B., Bartuś, S., i Sutkowska, E. (2018). The Role of Endothelium in Physiological and Pathological States: New Data. *BioMed Research International*, *2018*, 1–3. https://doi.org/10.1155/2018/1098039

Stanic, B., Kokai, D., Markovic Filipovic, J., Samardzija Nenadov, D., Pogrmic-Majkic, K., i Andric, N. (2023). Global gene expression analysis reveals novel transcription factors associated with long-term low-level exposure of EA.hy926 human endothelial cells to bisphenol A. *Chemico-Biological Interactions*, *381*, 110571. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110571

Stanic, B., Samardzija Nenadov, D., Fa, S., Pogrmic-Majkic, K., i Andric, N. (2021). Integration of data from the cell-based ERK1/2 ELISA and the Comparative Toxicogenomics Database deciphers the potential mode of action of bisphenol A and benzo[a]pyrene in lung neoplasm. *Chemosphere*, *285*, 131527. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131527

Stapleton, P. A., Goodwill, A. G., James, M. E., Brock, R. W., i Frisbee, J. C. (2010). Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: Interventional strategies. *Journal of Inflammation*, *7*(1), 54. https://doi.org/10.1186/1476-9255-7-54

Stegen, S., Van Gastel, N., i Carmeliet, G. (2015). Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone*, *70*, 19–27. https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.09.017

Stevanoska, M., Folz, J., Beekmann, K., i Aichinger, G. (2024). Physiologically based kinetic (PBK) modeling as a new approach methodology (NAM) for predicting systemic levels of gut microbial metabolites. *Toxicology Letters*, *396*, 94–102. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2024.04.013

Subramanian, A., Narayan, R., Corsello, S. M., Peck, D. D., Natoli, T. E., Lu, X., Gould, J., Davis, J. F., Tubelli, A. A., Asiedu, J. K., Lahr, D. L., Hirschman, J. E., Liu, Z., Donahue, M., Julian, B., Khan, M., Wadden, D., Smith, I. C., Lam, D., … Golub, T. R. (2017). A Next Generation Connectivity Map: L1000 Platform and the First 1,000,000 Profiles. *Cell*, *171*(6), 1437-1452.e17. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.049

Sun, S., Cao, W., Ge, Y., Ran, J., Sun, F., Zeng, Q., Guo, M., Huang, J., Lee, R. S.-Y., Tian, L., i Wellenius, G. A. (2021). Outdoor light at night and risk of coronary heart disease among older adults: A prospective cohort study. *European Heart Journal*, *42*(8), 822–830. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa846

Sunderland, E. M., Hu, X. C., Dassuncao, C., Tokranov, A. K., Wagner, C. C., i Allen, J. G. (2019). A review of the pathways of human exposure to poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) and present understanding of health effects. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, *29*(2), 131–147. https://doi.org/10.1038/s41370-018-0094-1

Takacs, M. L., i Abbott, B. D. (2007). Activation of Mouse and Human Peroxisome Proliferator–Activated Receptors (α, β/δ, γ) by Perfluorooctanoic Acid and Perfluorooctane Sulfonate. *Toxicological Sciences*, *95*(1), 108–117. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl135

Tao, L., Kannan, K., Wong, C. M., Arcaro, K. F., i Butenhoff, J. L. (2008). Perfluorinated Compounds in Human Milk from Massachusetts, U.S.A. *Environmental Science & Technology*, *42*(8), 3096–3101. https://doi.org/10.1021/es702789k

Tiruppathi, C., Minshall, R. D., Paria, B. C., Vogel, S. M., i Malik, A. B. (2002). Role of Ca2+ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascular Pharmacology*, *39*(4–5), 173–185. https://doi.org/10.1016/S1537-1891(03)00007-7

Tonini, T., Rossi, F., i Claudio, P. P. (2003). Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*, *22*(42), 6549–6556. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206816

U.S. EPA. (2025). *Fact Sheet: 2010/2015 PFOA Stewardship Program* [Fact sheet]. United States Environmental Protection Agency. https://www.epa.gov/assessing-and-managing-chemicals-under-tsca/fact-sheet-20102015-pfoa-stewardship-program

Vanden Heuvel, J. P., Thompson, J. T., Frame, S. R., i Gillies, P. J. (2006). Differential Activation of Nuclear Receptors by Perfluorinated Fatty Acid Analogs and Natural Fatty Acids: A Comparison of Human, Mouse, and Rat Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-α, -β, and -γ, Liver X Receptor-β, and Retinoid X Receptor-α. *Toxicological Sciences*, *92*(2), 476–489. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl014

Vandenberg, L. N. (2014). Non-Monotonic Dose Responses in Studies of Endocrine Disrupting Chemicals: Bisphenol a as a Case Study. *Dose-Response*, *12*(2), dose-response.13-020.Vandenberg. https://doi.org/10.2203/dose-response.13-020.Vandenberg

Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A. M., Vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., i Myers, J. P. (2012). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*, *33*(3), 378–455. https://doi.org/10.1210/er.2011-1050

Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Tang, E. H. C., i Feletou, M. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiologica*, *196*(2), 193–222. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01964.x

Verner, M.-A., Ngueta, G., Jensen, E. T., Fromme, H., Völkel, W., Nygaard, U. C., Granum, B., i Longnecker, M. P. (2016). A Simple Pharmacokinetic Model of Prenatal and Postnatal Exposure to Perfluoroalkyl Substances (PFASs). *Environmental Science & Technology*, *50*(2), 978–986. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04399

Vienneau, D., Schindler, C., Perez, L., Probst-Hensch, N., i Röösli, M. (2015). The relationship between transportation noise exposure and ischemic heart disease: A meta-analysis. *Environmental Research*, *138*, 372–380. https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.02.023

Vierke, L., Staude, C., Biegel-Engler, A., Drost, W., i Schulte, C. (2012). Perfluorooctanoic acid (PFOA)—Main concerns and regulatory developments in Europe from an environmental point of view. *Environmental Sciences Europe*, *24*(1), 16. https://doi.org/10.1186/2190-4715-24-16

Villar-Pazos, S., Martinez-Pinna, J., Castellano-Muñoz, M., Alonso-Magdalena, P., Marroqui, L., Quesada, I., Gustafsson, J.-A., i Nadal, A. (2017). Molecular

mechanisms involved in the non-monotonic effect of bisphenol-a on Ca2+ entry in mouse pancreatic β-cells. *Scientific Reports*, *7*(1), 11770. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11995-3

Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A., i Schwartz, S. M. (2000). Lessons From Sudden Coronary Death: A Comprehensive Morphological Classification Scheme for Atherosclerotic Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *20*(5), 1262–1275. https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.5.1262

Vreeken, D., Zhang, H., Van Zonneveld, A. J., i Van Gils, J. M. (2020). Ephs and Ephrins in Adult Endothelial Biology. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(16), 5623. https://doi.org/10.3390/ijms21165623

Wallez, Y., i Huber, P. (2008). Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1778*(3), 794–809. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.09.003

Wambaugh, J. F., Wetmore, B. A., Pearce, R., Strope, C., Goldsmith, R., Sluka, J. P., Sedykh, A., Tropsha, A., Bosgra, S., Shah, I., Judson, R., Thomas, R. S., i Setzer, R. W. (2015). Toxicokinetic Triage for Environmental Chemicals. *Toxicological Sciences*, *147*(1), 55–67. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv118

Wang, D., Tan, Z., Yang, J., Li, L., Li, H., Zhang, H., Liu, H., Liu, Y., Wang, L., Li, Q., i Guo, H. (2023). Perfluorooctane sulfonate promotes atherosclerosis by modulating M1 polarization of macrophages through the NF-κB pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *249*, 114384. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114384

Wang, J., Peng, H., Timur, A. A., Pasupuleti, V., Yao, Y., Zhang, T., You, S.-A., Fan, C., Yu, Y., Jia, X., Chen, J., Xu, C., Chen, Q., i Wang, Q. (2021). Receptor and Molecular Mechanism of AGGF1 Signaling in Endothelial Cell Functions and Angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.121.316867

Wang, J., Zhang, Y., Zhang, W., Jin, Y., i Dai, J. (2012). Association of Perfluorooctanoic Acid with HDL Cholesterol and Circulating miR-26b and miR-199–3p in Workers of a Fluorochemical Plant and Nearby Residents. *Environmental Science & Technology*, *46*(17), 9274–9281. https://doi.org/10.1021/es300906q

Wang, L. Q., Liu, T., Yang, S., Sun, L., Zhao, Z.-Y., Li, L. Y., She, Y. C., Zheng, Y.-Y., Ye, X.-Y., Bao, Q., Dong, G.-H., Li, C.-W., i Cui, J. (2021). Perfluoroalkyl substance pollutants activate the innate immune system through the AIM2 inflammasome. *Nature Communications*, *12*(1), 2915. https://doi.org/10.1038/s41467-021-23201-0

Wang, Z., DeWitt, J. C., Higgins, C. P., i Cousins, I. T. (2017). A Never-Ending Story of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs)? *Environmental Science & Technology*, *51*(5), 2508–2518. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04806

Weaver, Y. M., Ehresman, D. J., Butenhoff, J. L., i Hagenbuch, B. (2010). Roles of Rat Renal Organic Anion Transporters in Transporting Perfluorinated Carboxylates with Different Chain Lengths. *Toxicological Sciences*, *113*(2), 305–314. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp275

Wetmore, B. A. (2015). Quantitative in vitro-to-in vivo extrapolation in a high-throughput environment. *Toxicology*, *332*, 94–101. https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.05.012

WHO. (2016). *Ambient air pollution: A global assessment of exposure and burden of disease*. World Health Organization. https://apps.who.int/iris/handle/10665/250141

WHO. (2023). *Cardiovascular diseases (CVDs): Fact sheet*. World Health Organization. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)

Windred, D. P., Burns, A. C., Rutter, M. K., Lane, J. M., Saxena, R., Scheer, F. A. J. L., Cain, S. W., i Phillips, A. J. K. (2025). Light Exposure at Night and Cardiovascular Disease Incidence. *JAMA Network Open*, *8*(10), e2539031. https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2025.39031

Wisse, E. (1970). An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *Journal of Ultrastructure Research*, *31*(1–2), 125–150. https://doi.org/10.1016/S0022-5320(70)90150-4

Wong, M., i Munro, S. (2014). The specificity of vesicle traffic to the Golgi is encoded in the golgin coiled-coil proteins. *Science*, *346*(6209), 1256898. https://doi.org/10.1126/science.1256898

Wu, B., Sheng, N., Li, Z., Wang, J., Ji, S., Zhao, F., Pan, Y., Qu, Y., Wei, Y., Xie, L., Li, Y., Hu, X., Wu, C., Zhang, Z., Qiu, Y., Zheng, X., Zhang, W., Hu, X., Song, H., … Shi, X. (2024). Positive Associations of Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances With Hypertension May Be Attenuated by Endogenous Sex Hormones: A Nationally Representative Cross-Sectional Study. *Hypertension*, *81*(8), 1799–1810. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.123.22127

Wu, J. (2021). The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *Journal of Personalized Medicine*, *11*(8), 771. https://doi.org/10.3390/jpm11080771

Wu, X., Hu, Z., Yuan, H., Chen, L., Li, Y., i Zhao, C. (2017). Fluid resuscitation and markers of glycocalyx degradation in severe sepsis. *Open Medicine*, *12*(1), 409–416. https://doi.org/10.1515/med-2017-0059

Xiao, F., An, Z., Lv, J., Sun, X., Sun, H., Liu, Y., Liu, X., i Guo, H. (2023). Association between per- and polyfluoroalkyl substances and risk of hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Public Health*, *11*, 1173101. https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1173101

Xie, Y., i Xie, W. (2020). The Role of Sulfotransferases in Liver Diseases. *Drug Metabolism and Disposition*, *48*(9), 742–749. https://doi.org/10.1124/dmd.120.000074

Xu, D., Li, L., Tang, L., Guo, M., i Yang, J. (2022). Perfluorooctane sulfonate induces heart toxicity involving cardiac apoptosis and inflammation in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *23*(1), 14. https://doi.org/10.3892/etm.2021.10936

Xu, M., Cui, Z., Zhao, L., Hu, S., Zong, W., i Liu, R. (2018). Characterizing the binding interactions of PFOA and PFOS with catalase at the molecular level. *Chemosphere*, *203*, 360–367. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.200

Xu, Y., Nielsen, C., Li, Y., Hammarstrand, S., Andersson, E. M., Li, H., Olsson, D. S., Engström, K., Pineda, D., Lindh, C. H., Fletcher, T., i Jakobsson, K. (2021). Serum perfluoroalkyl substances in residents following long-term drinking water contamination from firefighting foam in Ronneby, Sweden. *Environment International*, *147*, 106333. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106333

Yang, L., Allen, B. C., i Thomas, R. S. (2007). BMDExpress: A software tool for the benchmark dose analyses of genomic data. *BMC Genomics*, *8*(1), 387. https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-387

Yang, Y. D., Tian, R., i Lu, N. (2023). Binding of serum albumin to perfluorooctanoic acid reduced cytotoxicity. *Science of The Total Environment*, *876*, 162738. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162738

Ye, Z., Guo, H., Wang, L., Li, Y., Xu, M., Zhao, X., Song, X., Chen, Z., i Huang, R. (2022). GALNT4 primes monocytes adhesion and transmigration by regulating O-Glycosylation of PSGL-1 in atherosclerosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *165*, 54–63. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2021.12.012

Yeung, L. W. Y., Guruge, K. S., Taniyasu, S., Yamashita, N., Angus, P. W., i Herath, C. B. (2013). Profiles of perfluoroalkyl substances in the liver and serum of patients with liver cancer and cirrhosis in Australia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *96*, 139–146. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.06.006

Yuan, M., Zhang, T., Sun, Y., Yi, S., Han, G., Wei, P., Chen, X., Wang, Y., i Zhu, L. (2025). Microglia-Mediated Pathological Retinal Angiogenesis Leading to Visual Impairment in Mice Exposed to Perfluorooctanoic Acid. *Environmental Science & Technology*, *59*(30), 15680–15691. https://doi.org/10.1021/acs.est.5c03180

Yue, Q., Yu, L., Liu, W., Zhou, J., Hu, X., Liu, Y., Zhou, X., Wu, L., Xu, B., Tong, X., Jiang, X., Yan, G., i Bai, S. (2022). Homeodomain protein HOMEZ is dispensable for male fertility in mice. *Translational Andrology and Urology*, *11*(6), 750–760. https://doi.org/10.21037/tau-21-1169

Zare Jeddi, M., Soltanmohammadi, R., Barbieri, G., Fabricio, A. S. C., Pitter, G., Dalla Zuanna, T., i Canova, C. (2021). To which extent are per-and poly-fluorinated substances associated to metabolic syndrome? *Reviews on Environmental Health*, *37*(2), 211–228. https://doi.org/10.1515/reveh-2020-0144

Zeng, H., He, Q., Li, Y., Wu, C., Wu, Y., i Xu, S. (2015). Prenatal exposure to PFOS caused mitochondia-mediated apoptosis in heart of weaned rat. *Environmental Toxicology*, *30*(9), 1082–1090. https://doi.org/10.1002/tox.21981

Zeng, X. W., Qian, Z., Emo, B., Vaughn, M., Bao, J., Qin, X. D., Zhu, Y., Li, J., Lee, Y. L., i Dong, G. H. (2015). Association of polyfluoroalkyl chemical exposure with serum lipids in children. *Science of The Total Environment*, *512–513*, 364–370. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.042

Zeng, Z., Song, B., Xiao, R., Zeng, G., Gong, J., Chen, M., Xu, P., Zhang, P., Shen, M., i Yi, H. (2019). Assessing the human health risks of perfluorooctane sulfonate by in vivo and in vitro studies. *Environment International*, *126*, 598–610. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.002

Zhang, Q., Wang, J., Chen, C., Kong, Y., Yan, H., Duan, J., Wang, C., Sha, Y., Wen, X., i Wang, C. (2019). Perfluorooctanoic acid induces migration and invasion and inhibits apoptosis through the PI3K/AKT signaling pathway in human rhabdomyosarcoma cells. *Oncology Reports*. https://doi.org/10.3892/or.2019.7265

Zhang, S. S., Kim, K. H., Rosen, A., Smyth, J. W., Sakuma, R., Delgado-Olguín, P., Davis, M., Chi, N. C., Puviindran, V., Gaborit, N., Sukonnik, T., Wylie, J. N., Brand-Arzamendi, K., Farman, G. P., Kim, J., Rose, R. A., Marsden, P. A., Zhu, Y., Zhou, Y.-Q., … Backx, P. H. (2011). *Iroquois homeobox gene 3* establishes fast conduction in the cardiac His–Purkinje network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(33), 13576–13581. https://doi.org/10.1073/pnas.1106911108

Zhang, Y., Beesoon, S., Zhu, L., i Martin, J. W. (2013). Biomonitoring of Perfluoroalkyl Acids in Human Urine and Estimates of Biological Half-Life. *Environmental Science & Technology*, *47*(18), 10619–10627. https://doi.org/10.1021/es401905e

Zhao, L., Teng, M., Zhao, X., Li, Y., Sun, J., Zhao, W., Ruan, Y., Leung, K. M. Y., i Wu, F. (2023). Insight into the binding model of per- and polyfluoroalkyl substances to proteins and membranes. *Environment International*, *175*, 107951. https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107951

Zhao, M., Jiang, Q., Geng, M., Zhu, L., Xia, Y., Khanal, A., i Wang, C. (2017). The role of PPAR alpha in perfluorooctanoic acid induced developmental cardiotoxicity and l-carnitine mediated protection–Results of in ovo gene silencing. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *56*, 136–144. https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.09.006

Zheng, J., Sun, B., Berardi, D., Lu, L., Yan, H., Zheng, S., Aladelokun, O., Xie, Y., Cai, Y., Godri Pollitt, K. J., Khan, S. A., i Johnson, C. H. (2023). Perfluorooctanesulfonic Acid and Perfluorooctanoic Acid Promote Migration of Three-Dimensional Colorectal Cancer Spheroids. *Environmental Science & Technology*, *57*(50), 21016–21028. https://doi.org/10.1021/acs.est.3c04844

Zhou, Z., Shi, Y., Vestergren, R., Wang, T., Liang, Y., i Cai, Y. (2014). Highly Elevated Serum Concentrations of Perfluoroalkyl Substances in Fishery Employees from Tangxun Lake, China. *Environmental Science & Technology*, *48*(7), 3864–3874. https://doi.org/10.1021/es4057467

Zhuo, M., Fu, S., Chi, Y., Li, X., Li, S., Ma, X., i Li, X. (2024). Angiopoietin-2 as a prognostic biomarker in septic adult patients: A systemic review and meta-analysis. *Annals of Intensive Care*, *14*(1), 169. https://doi.org/10.1186/s13613-024-01393-0

Zoeller, R. T., i Vandenberg, L. N. (2015). Assessing dose–response relationships for endocrine disrupting chemicals (EDCs): A focus on non-monotonicity. *Environmental Health*, *14*(1), 42. https://doi.org/10.1186/s12940-015-0029-4

9. PRILOZI

Prilog 1. Parametri kvaliteta RNK sekvenciranih uzoraka

Uzorak	Koncentracija (ng/μL)	Zapremina (μL)	Ukupna masa (μg)	RIN	28S/18S
0 μM PFOS – 1	132,0	50,0	6,600	8,1	1,8
0 μM PFOS – 2	115,0	50,0	5,750	9,8	2,7
0 μM PFOS – 3	148,0	50,0	7,400	9,8	2,8
1 μM PFOS – 1	159,0	50,0	7,950	9,5	2,5
1 μM PFOS – 2	215,0	50,0	10,750	9,2	2,5
1 μM PFOS – 3	155,0	50,0	7,750	9,8	2,6
10 μM PFOS – 1	136,0	50,0	6,800	9,3	2,5
10 μM PFOS – 2	148,0	50,0	7,400	8,5	2,3
10 μM PFOS – 3	168,0	50,0	8,400	9,6	2,6
100 μM PFOS – 1	130,0	50,0	6,500	9,5	2,6
100 μM PFOS – 2	150,0	50,0	7,500	8,6	2,2
100 μM PFOS – 3	151,0	50,0	7,550	9,8	2,6
0 μM PFOA – 1	220,0	49,0	10,780	8,7	2,3
0 μM PFOA – 2	186,0	49,0	9,114	9,9	2,7
0 μM PFOA – 3	176,0	49,0	8,624	8,6	2,2
1 μM PFOA – 1	147,0	49,0	7,203	9,1	2,5
1 μM PFOA – 2	154,0	49,0	7,546	7,8	2,4
1 μM PFOA – 3	170,0	49,0	8,330	9,7	2,5
10 μM PFOA – 1	90,9	45,0	4,091	7,7	2,8
10 μM PFOA – 2	123,0	45,0	5,535	8,1	1,8
10 μM PFOA – 3	105,0	46,0	4,830	8,2	1,9
100 μM PFOA – 1	209,0	49,0	10,241	9,9	2,7
100 μM PFOA – 2	182,0	49,0	8,918	8,7	2,4
100 μM PFOA – 3	171,0	49,0	8,379	9,7	2,6

Prilog 2. Statistika podataka sekvenciranja RNK svih uzoraka

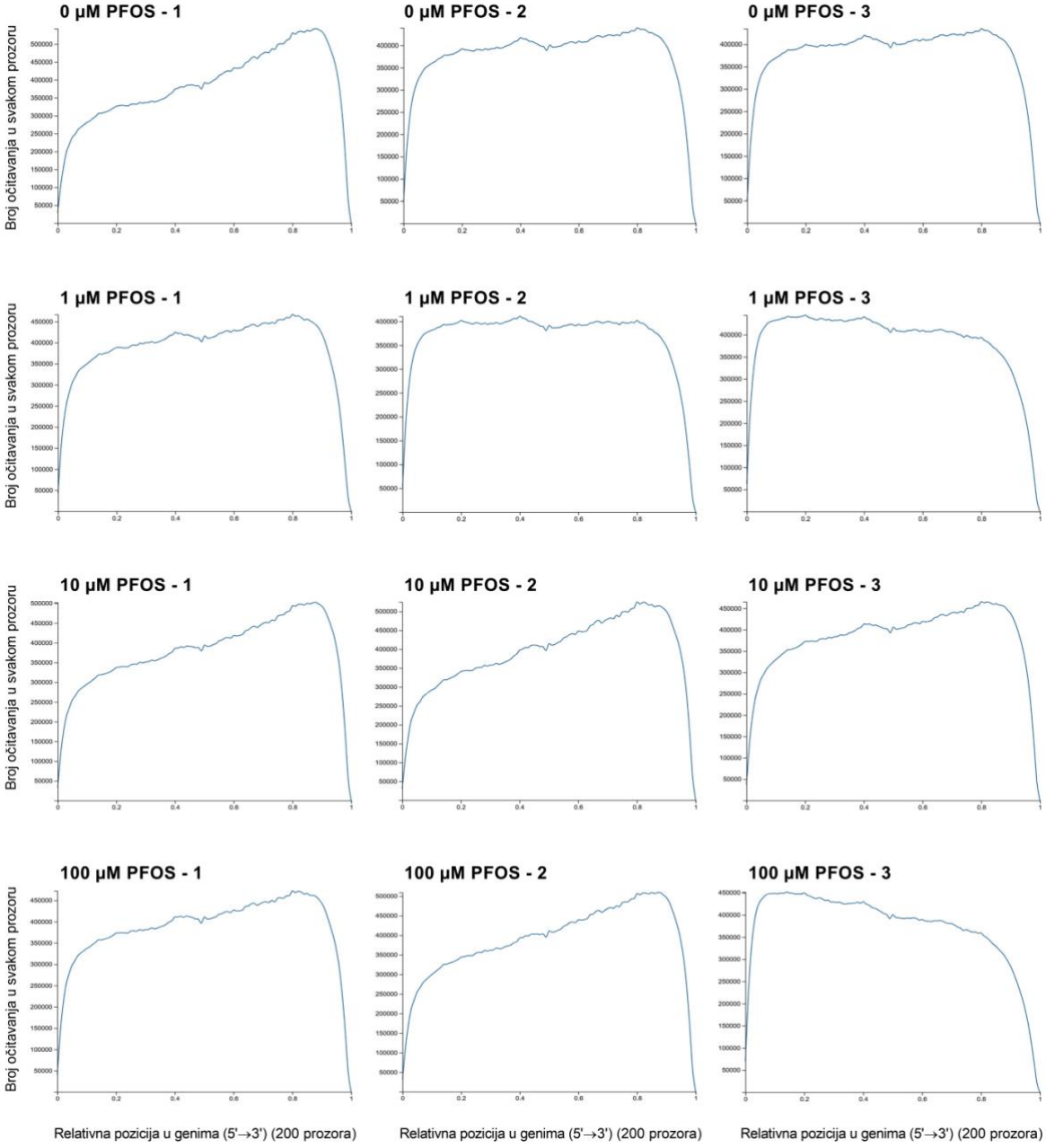
Uzorak	Sirova očitavanja	Očitavanja sa N		Očitavanja sa adapterima		Očitavanja niskog kvaliteta		Čista očitavanja
	(milioni)	(broj)	(%)	(broj)	(%)	(broj)	(%)	(milioni)
0 μM PFOS – 1	23,37	473784	2,03	780956	3,34	46810	0,20	22,07
0 μM PFOS – 2	23,33	454568	1,95	719160	3,08	43956	0,19	22,11
0 μM PFOS – 3	23,35	479590	2,05	736994	3,16	43458	0,19	22,09
1 μM PFOS – 1	24,66	502540	2,08	1572010	6,37	52054	0,21	22,52
1 μM PFOS – 2	23,51	489050	1,83	1107778	4,71	40760	0,17	21,93
1 μM PFOS – 3	24,42	426584	1,87	1161298	4,75	43526	0,18	22,76
10 μM PFOS – 1	23,41	458652	1,96	887788	3,79	44630	0,19	22,02
10 μM PFOS – 2	23,29	469662	2,02	630718	2,71	41740	0,18	22,15
10 μM PFOS – 3	23,29	489182	2,10	604256	2,59	46410	0,20	22,15
100 μM PFOS – 1	23,30	502540	2,16	615498	2,64	47718	0,20	22,14
100 μM PFOS – 2	23,25	489050	2,10	527572	2,27	50476	0,22	22,19
100 μM PFOS – 3	23,39	426584	1,82	873894	3,74	47620	0,20	22,05
0 μM PFOA – 1	23,24	426122	1,83	568676	2,45	41730	0,18	22,20
0 μM PFOA – 2	24,46	520742	1,93	1157960	4,74	45750	0,19	22,73
0 μM PFOA – 3	23,28	469974	2,04	602674	2,59	49260	0,21	22,16
1 μM PFOA – 1	23,51	480468	1,93	1050612	4,47	42406	0,18	21,93
1 μM PFOA – 2	24,43	440626	1,98	1183778	4,85	43588	0,18	22,76
1 μM PFOA – 3	23,49	450476	1,99	1059550	4,51	41350	0,18	21,94
10 μM PFOA – 1	23,23	449392	2,04	538952	2,32	42700	0,18	22,20
10 μM PFOA – 2	23,51	465644	1,80	1074172	4,57	46050	0,20	21,93
10 μM PFOA – 3	23,23	463322	1,92	522310	2,25	44680	0,19	22,20
100 μM PFOA – 1	23,24	426098	1,83	566628	2,44	46998	0,20	22,20
100 μM PFOA – 2	23,19	448206	2,13	458380	1,98	45116	0,19	22,24
100 μM PFOA – 3	23,41	477352	2,02	856274	3,66	42338	0,18	22,03

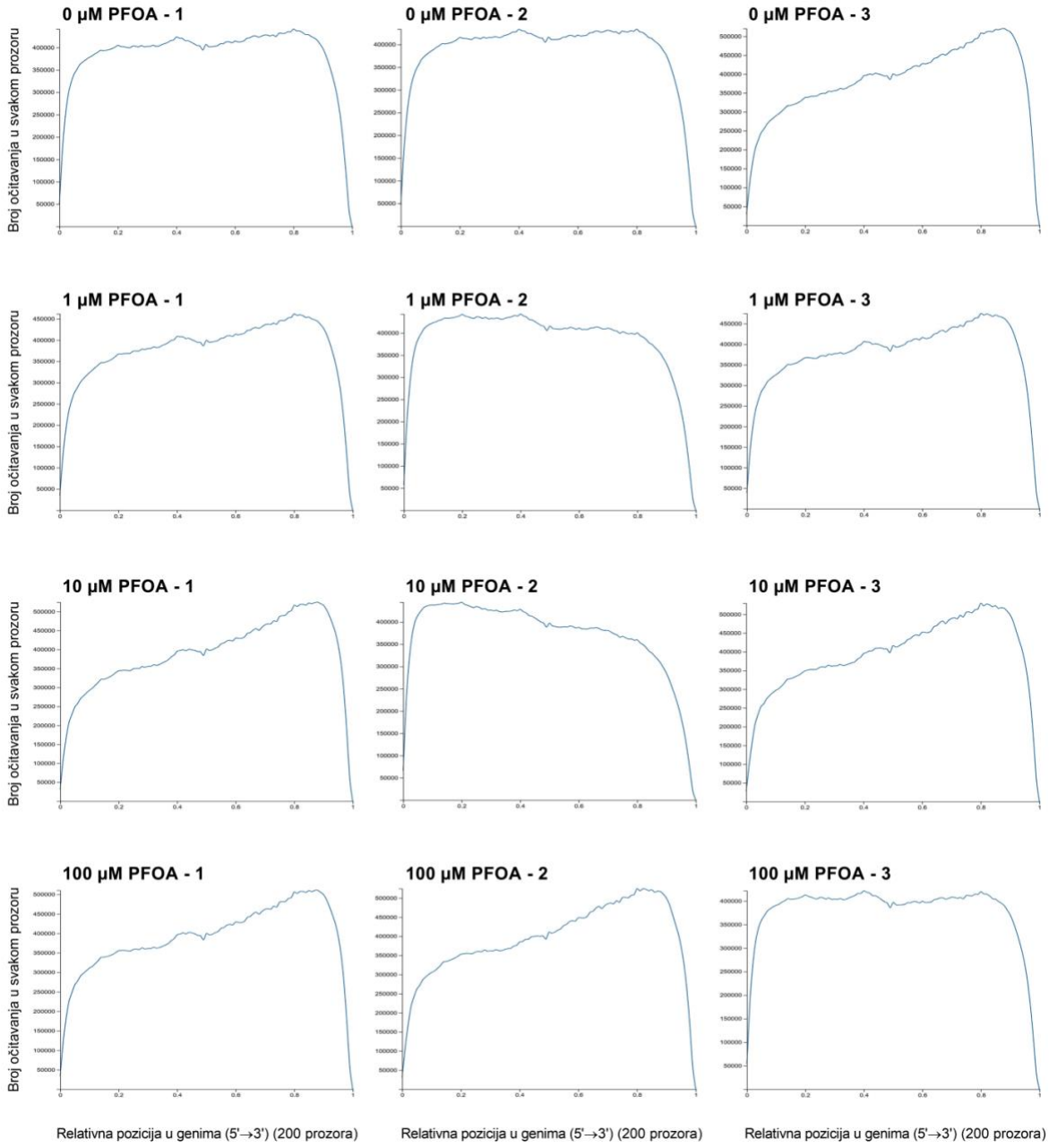
Prilog 3. Stopa poravnanja RNK sekvenciranih uzoraka na referentni genom i referentne gene

Uzorak	Referentni genom		Referentni geni	
	Ukupno poravnanje (%)	Jedinstveno poravnanje (%)	Ukupno poravnanje (%)	Jedinstveno poravnanje (%)
0 μM PFOS – 1	98,81	89,62	87,01	82,70
0 μM PFOS – 2	98,85	90,04	87,16	82,91
0 μM PFOS – 3	98,85	89,84	88,01	83,37
1 μM PFOS – 1	98,46	89,44	86,01	81,73
1 μM PFOS – 2	97,79	89,32	86,07	81,78
1 μM PFOS – 3	98,64	90,07	86,83	82,39
10 μM PFOS – 1	97,57	88,12	85,55	81,16
10 μM PFOS – 2	98,89	89,16	85,54	81,40
10 μM PFOS – 3	98,85	89,81	85,97	81,70
100 μM PFOS – 1	98,85	89,47	83,77	79,80
100 μM PFOS – 2	98,85	89,24	84,90	80,88
100 μM PFOS – 3	98,77	90,38	84,94	81,03
0 μM PFOA – 1	99,00	89,80	87,24	82,69
0 μM PFOA – 2	98,58	89,71	87,99	83,59
0 μM PFOA – 3	98,74	89,03	88,33	83,70
1 μM PFOA – 1	98,55	89,37	86,60	82,10
1 μM PFOA – 2	98,69	90,08	86,76	82,38
1 μM PFOA – 3	98,68	89,33	87,05	82,49
10 μM PFOA – 1	98,91	89,61	85,49	81,03
10 μM PFOA – 2	98,72	90,32	85,86	81,55
10 μM PFOA – 3	98,94	88,84	86,25	81,66
100 μM PFOA – 1	98,91	89,13	84,67	80,75
100 μM PFOA – 2	99,01	89,29	84,89	80,82
100 μM PFOA – 3	98,78	89,88	85,18	80,96

Prilog 4. Distribucija očitavanja duž transkripata sekvenciranih uzoraka

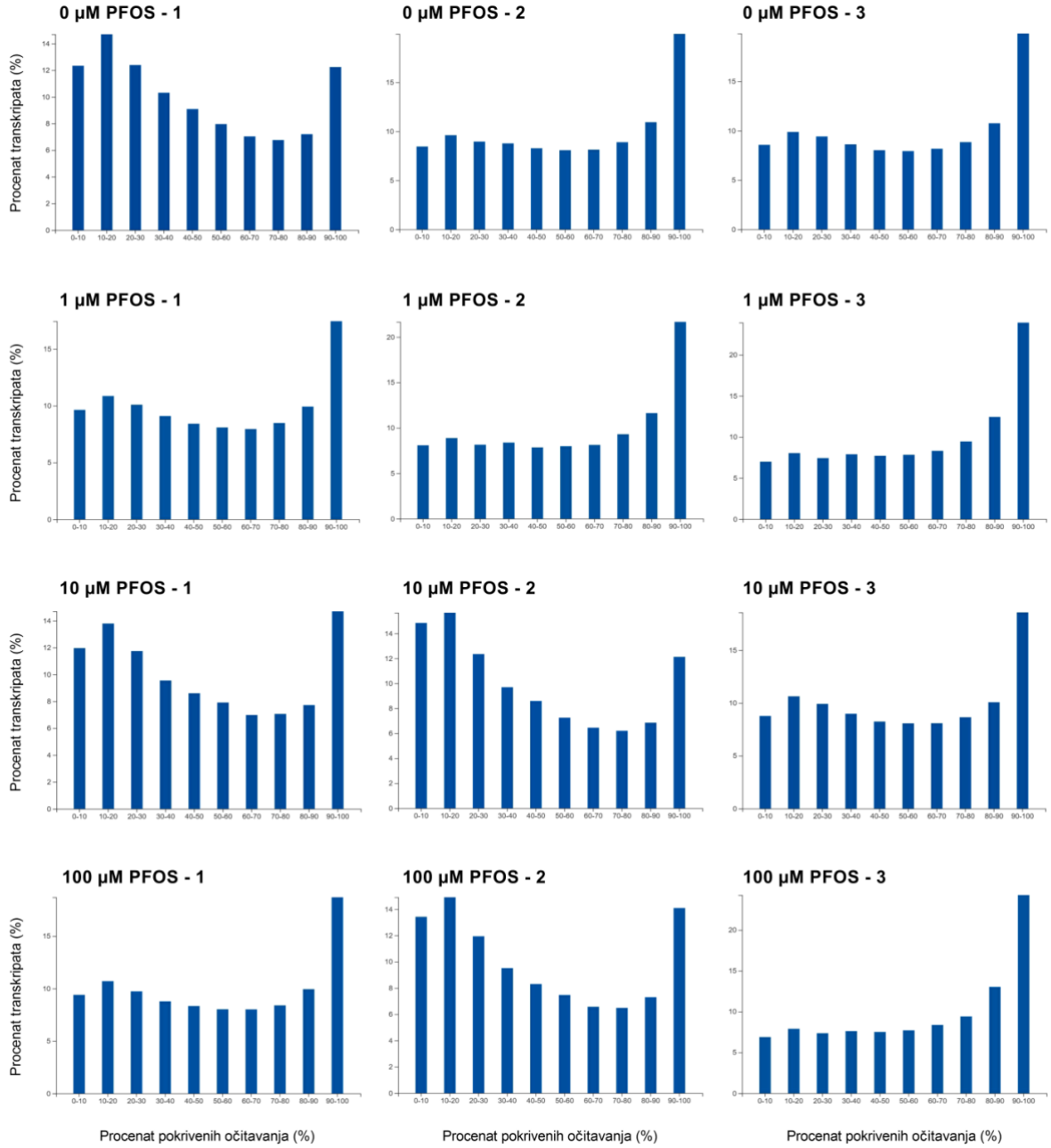
X-osa predstavlja poziciju transkripta (podešeno je 200 kliznih prozora), dok y-osa predstavlja broj očitavanja (izračunato za svaki klizni prozor).

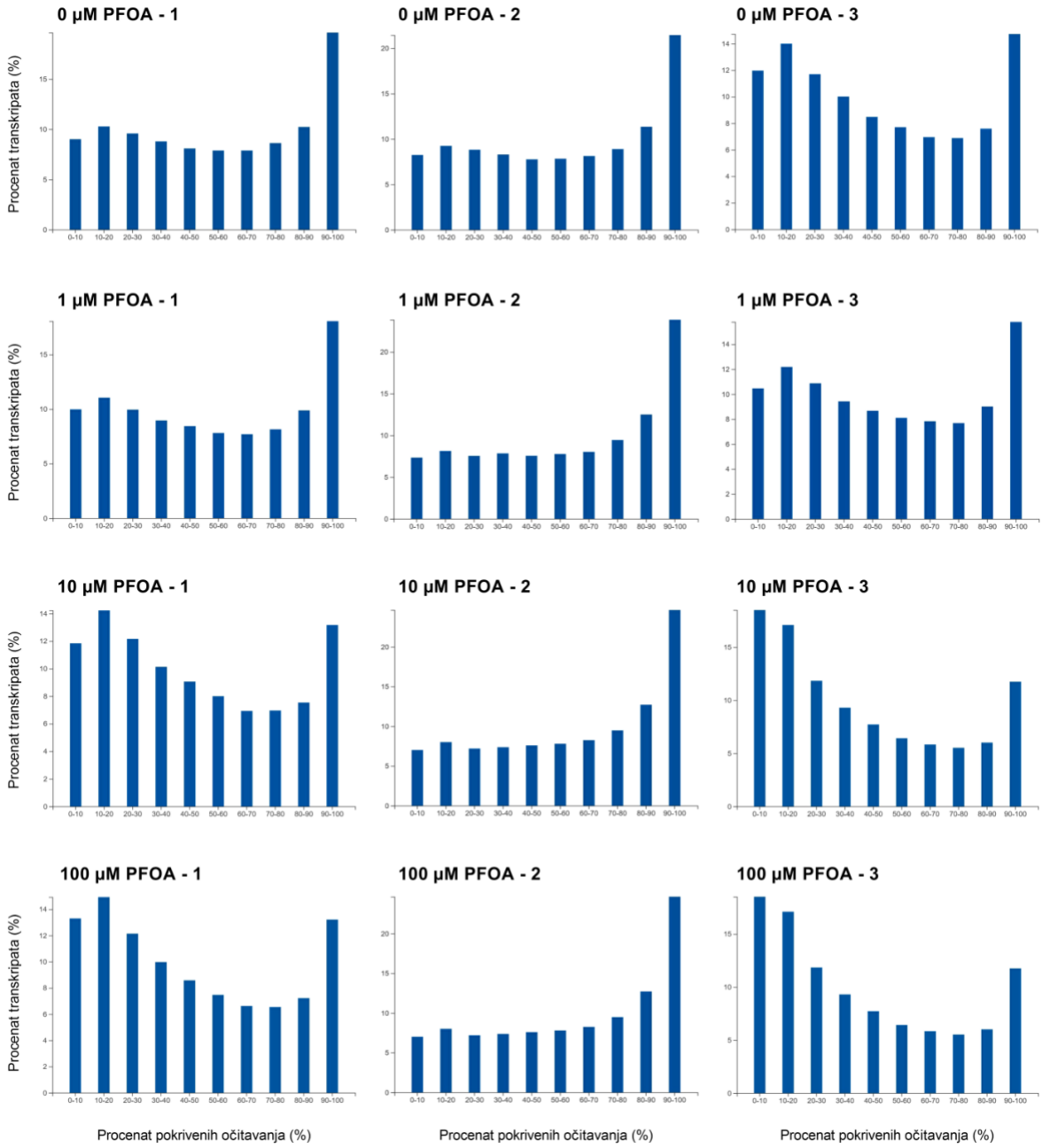



0 µM PFOA - 1
0 µM PFOA - 2
0 µM PFOA - 3
1 µM PFOA - 1
1 µM PFOA - 2
1 µM PFOA - 3
10 µM PFOA - 1
10 µM PFOA - 2
10 µM PFOA - 3
100 µM PFOA - 1
100 µM PFOA - 2
100 µM PFOA - 3
Broj očitavanja u svakom prozoru
Relativna pozicija u genima (5'→3') (200 prozora)

Prilog 5. Pokrivenost transkripata očitavanjima za sve sekvencirane uzorke

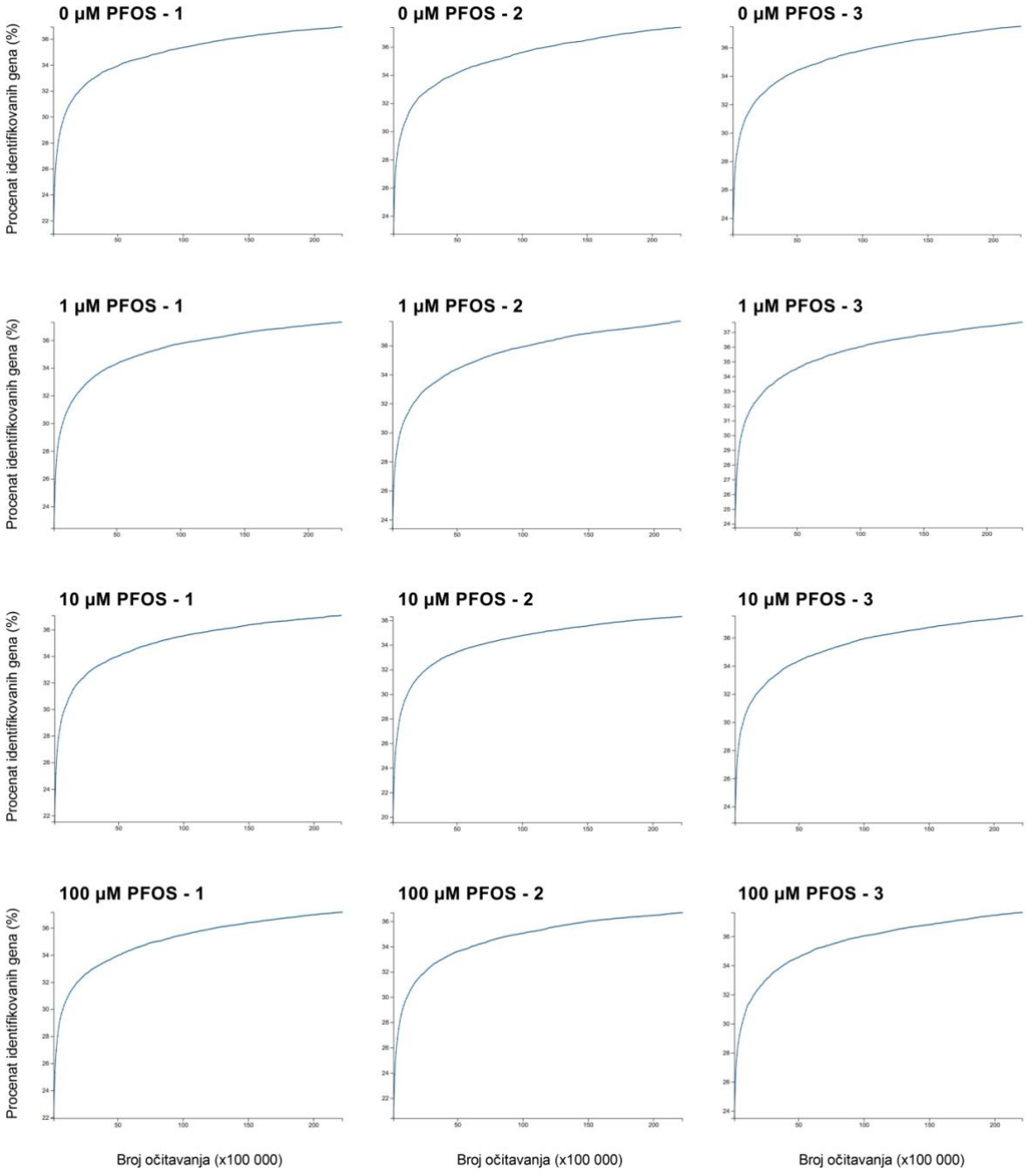
Na x-osi prikazan je stepen pokrivenosti transkripata očitavanjima, dok y-osa prikazuje procenat transkripata.

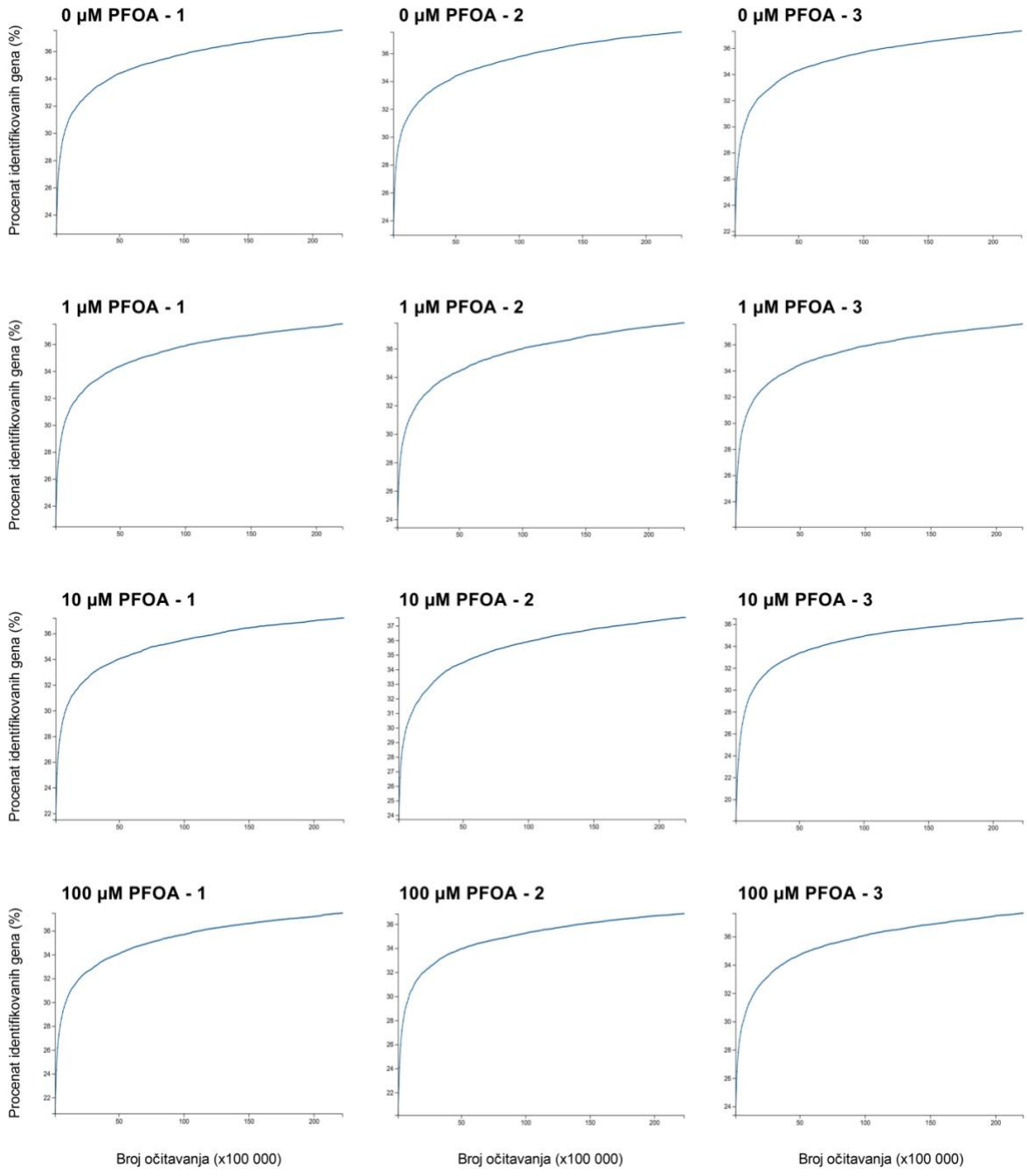



0 μM PFOA - 1
0 μM PFOA - 2
0 μM PFOA - 3
1 μM PFOA - 1
1 μM PFOA - 2
1 μM PFOA - 3
10 μM PFOA - 1
10 μM PFOA - 2
10 μM PFOA - 3
100 μM PFOA - 1
100 μM PFOA - 2
100 μM PFOA - 3
Procenat transkripata (%)
0-10
10-20
20-30
30-40
40-50
50-60
60-70
70-80
80-90
90-100
Procenat pokrivenih očitavanja (%)

Prilog 6. Analiza zasićenja sekvenciranja za sve sekvencirane uzorke

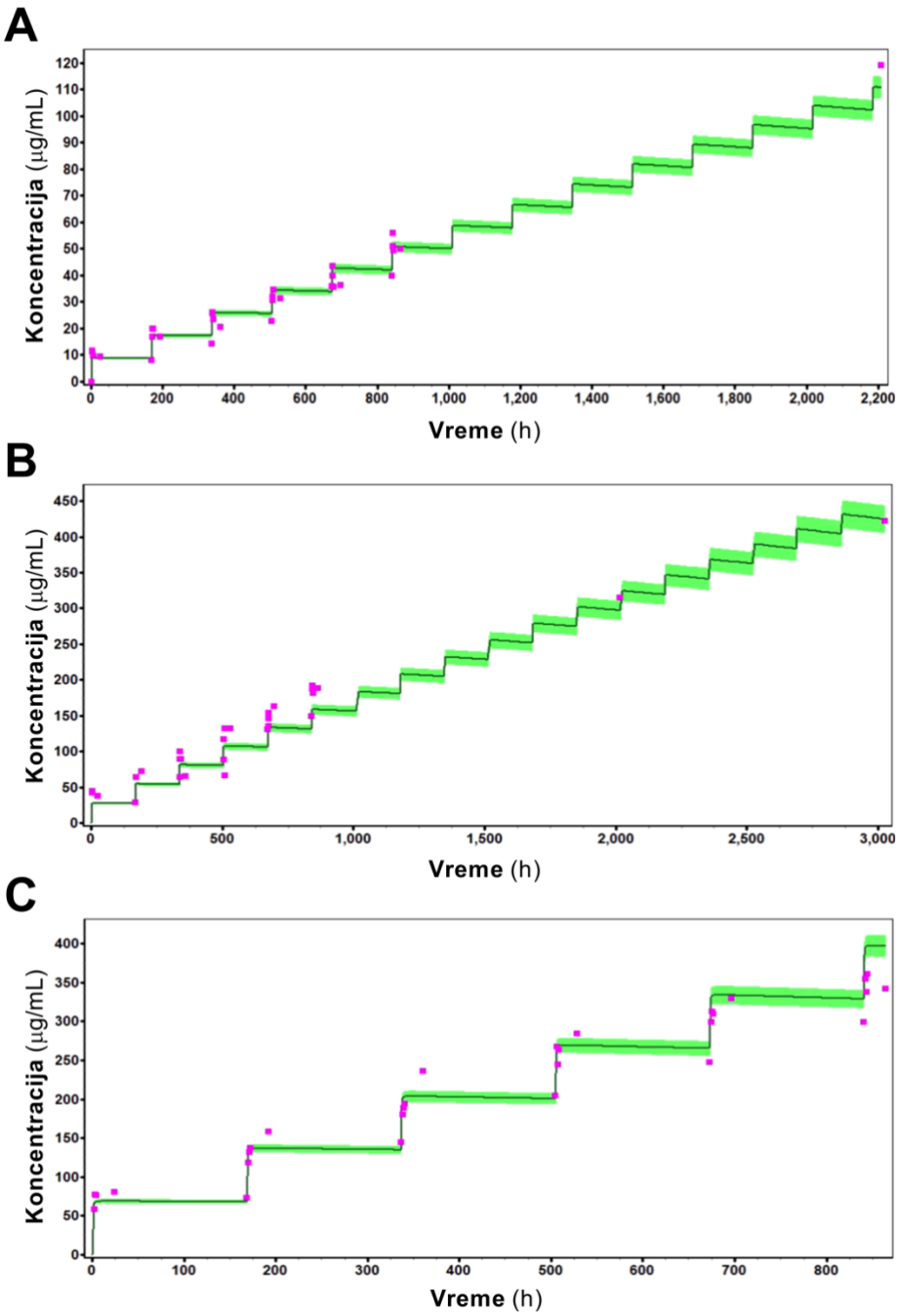
Na x-osi je prikazan broj čistih očitavanja (u jedinicama od po 100 hiljada), što odgovara obimu sekvenciranja uzorka; y-osa prikazuje udeo detektovanih gena, izražen u procentima.




0 µM PFOA - 1
0 µM PFOA - 2
0 µM PFOA - 3
1 µM PFOA - 1
1 µM PFOA - 2
1 µM PFOA - 3
10 µM PFOA - 1
10 µM PFOA - 2
10 µM PFOA - 3
100 µM PFOA - 1
100 µM PFOA - 2
100 µM PFOA - 3
Procenat identifikovanih gena (%)
Broj očitavanja (x100 000)

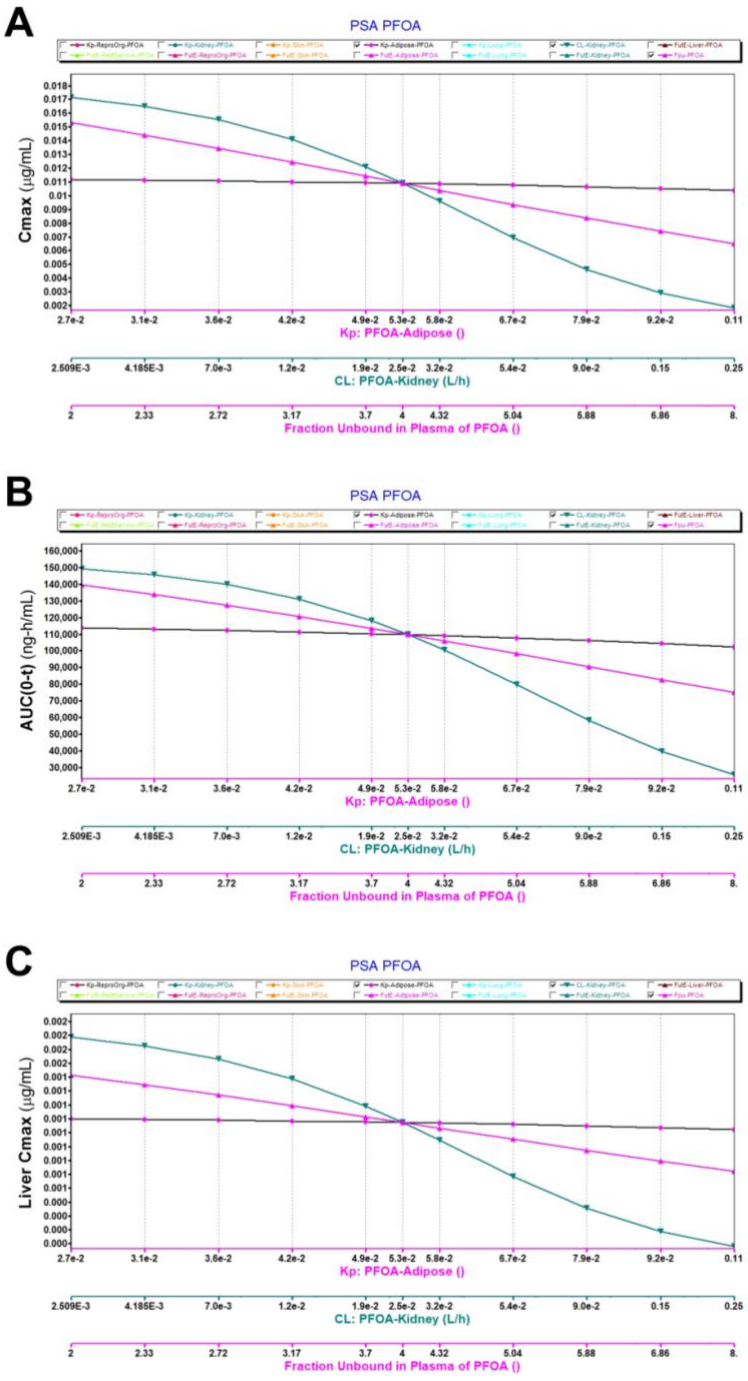
Prilog 7. Profili koncentracije perfluorooktanske kiseline u plazmi kroz vreme: poređenje posmatranih podataka sa predikcijama PBTK modela

Prikazane su oralne doze: **(A)** 100 mg, **(B)** 300 mg i **(C)** 750 mg. Posmatrani srednji nivoi – ljubičasti kvadrati; srednja vrednost predikcije modela – zelena linija; 90% interval predikcije – svetlozelena traka. Koncentracija je izražena u µg/mL, a vreme (h) je mereno od prve doze.



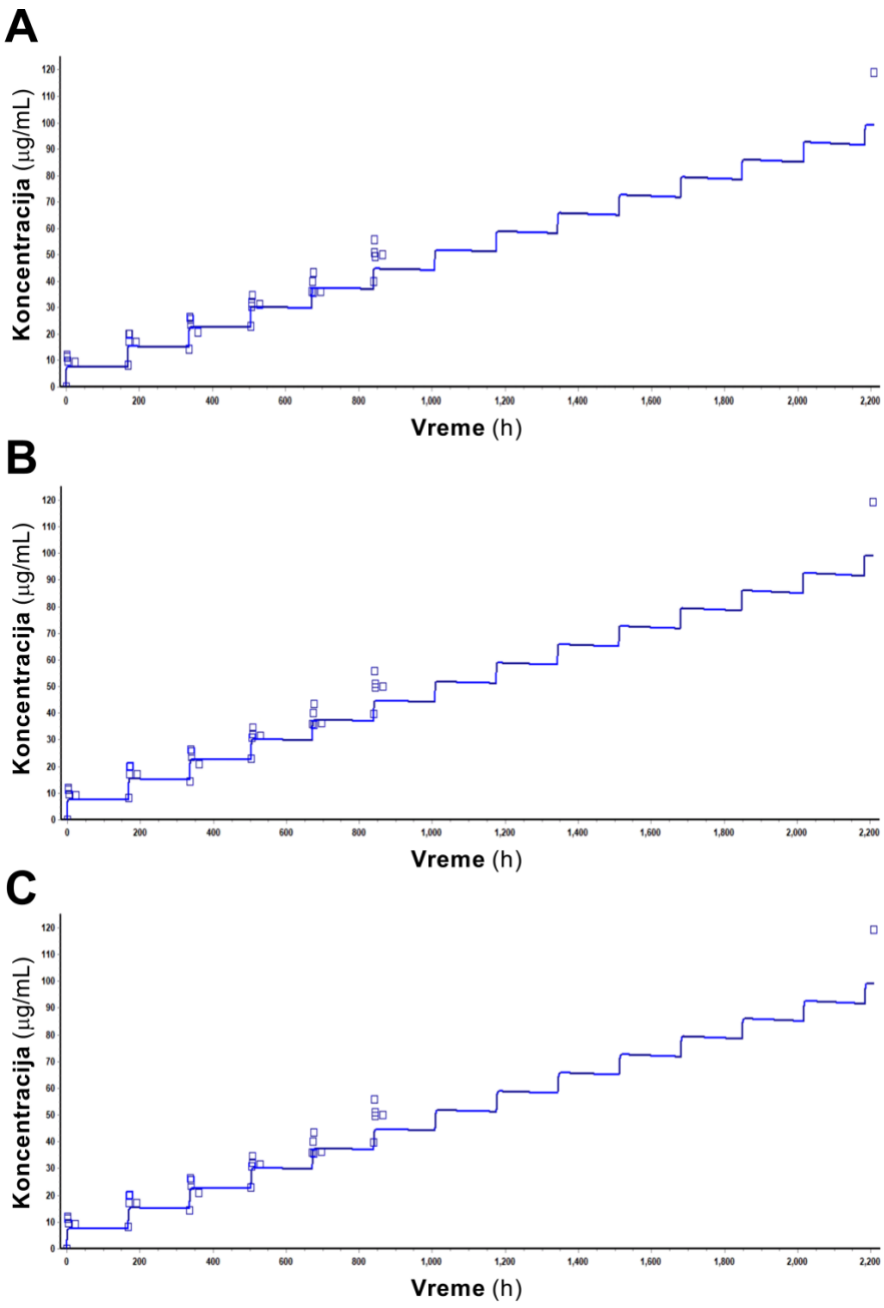
Prilog 8. Analiza osetljivosti parametara (PSA) PBTK modela za perfluorooktansku kiselinu

Prikazan je uticaj tri ključna parametra – bubrežni klirens (CL: PFOA-Kidney, L/h), frakcija nevezana u plazmi (fu) i koeficijent raspodele u masnom tkivu (Kp: PFOA-Adipose) – na **(A)** Cmax u plazmi, **(B)** AUC(0–t) i **(C)** maksimalnu koncentraciju u jetri (Liver Cmax). X-osa prikazuje ispitivane vrednosti parametara, a Y-osa odgovarajuću farmakokinetičku metriku (Cmax i Liver Cmax u µg/mL; AUC(0–t) u µg·h/mL). Krive predstavljaju simulirane vrednosti pri variranju pojedinačnog parametra u definisanom rasponu, dok su ostali parametri zadržani na nominalnim vrednostima.



Prilog 9. Poređenje posmatranih i PBTK modelom predviđenih koncentracija perfluorooktanske kiseline u plazmi kroz vreme nakon primene doze od 100 mg

Prikazani su oblici doze i stanja ishrane: **(A)** kapsule sa trenutnim oslobađanjem, natašte; **(B)** rastvor sa trenutnim oslobađanjem (IR), natašte; **(C)** kapsule sa trenutnim oslobađanjem, nakon obroka. Posmatrane vrednosti – otvoreni kvadrati; predviđena srednja vrednost – plava linija. Koncentracija je izražena u µg/mL, a vreme (h) je mereno od prve doze.



Prilog 10. Definicije kohorti i izvori podataka korišćenih za procenu izloženosti perfluorooktansulfonatu u opštim (G1–G11) i profesionalno izloženim populacijama (O1–O5)

Populacija	Država/Region	Starosna grupa	Matriks	Jedinica	P50	Izvor podataka
G1	Severna Evropa	Odrasli	Plazma	ng/mL	5,30	https://ipchem.jrc.ec.europa.eu/RDSIdiscovery/ipchem/index.html#showmetadata/DKDEMOCOPHES
G2	Južna Evropa	Odrasli	Serum	ng/mL	7,22	https://ipchem.jrc.ec.europa.eu/RDSIdiscovery/ipchem/index.html#showmetadata/BIOAMBIENTES
G3	Zapadna Evropa	Odrasli	Plazma	ng/mL	1,82	https://ipchem.jrc.ec.europa.eu/#showmetadata/ESB
G4	Istočna Evropa	Odrasli	Serum	ng/mL	2,74	https://ipchem.jrc.ec.europa.eu/RDSIdiscovery/ipchem/index.html#showmetadata/CZECHHBMAE2018
G5	Zapadna Evropa	Odrasli	Serum	ng/mL	1,00	https://ipchem.jrc.ec.europa.eu/index.html#showmetadata/NEWDA
G6	Japan	Odrasli	Serum	ng/mL	4,96	https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460933
G7	Japan	Odrasli	Serum	ng/mL	5,60	https://doi.org/10.1038/s41598-021-89285-2
G8	Južna Koreja	Odrasli	Serum	ng/mL	12,70	https://doi.org/10.1016/j.envint.2025.109585
G9	Tajland	Odrasli	Serum	ng/mL	2,62	https://doi.org/10.3390/toxics11121015
G10	SAD	Odrasli	Serum	ng/mL	2,60	https://www.epa.gov/americaschildrenenvironment/biomonitoring-perfluorochemicals-pfcs
G11	Kanada	Odrasli	Serum	ng/mL	3,60	https://doi.org/10.1186/s12940-025-01165-8
O1	Australija	Odrasli	Serum	ng/mL	66,00	https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.05.005
O2	SAD	Odrasli	Serum	ng/mL	626,00	https://doi.org/10.1289/ehp.10009
O3	SAD	Odrasli	Serum	ng/mL	14,90	https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2024.114321
O4	Danska	Odrasli	Serum	ng/mL	6,92	https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2025.114559
O5	Kina	Odrasli	Serum	ng/mL	33,46	https://doi.org/10.1021/es300906q

Prilog 11. Definicije kohorti i izvori podataka korišćenih za procenu izloženosti perfluorooktanskoj kiselini u opštim (G1–G9) i profesionalno izloženim populacijama (O1–O5)

Populacija	Država/Region	Starosna grupa	Matriks	Jedinica	P50	Izvor podataka
G1	Češka	Odrasli	Serum	ng/mL	1,47	https://ipchem.jrc.ec.europa.eu/#showmetadata/CZECHHBMAE2018
G2	Danska	Odrasli	Serum	ng/mL	1,65	https://ipchem.jrc.ec.europa.eu/#showmetadata/OCC
G3	Španija	Odrasli	Serum	ng/mL	1,91	https://ipchem.jrc.ec.europa.eu/#showmetadata/BIOAMBIENTES
G4	Belgija	Odrasli	Serum	ng/mL	3,5	https://ipchem.jrc.ec.europa.eu/#showmetadata/FLEHS2REFADULT
G5	Austrija	Odrasli	Serum	ng/mL	0,81	https://ipchem.jrc.ec.europa.eu/index.html#showmetadata/NEWDA
G6	SAD	Odrasli	Serum	ng/mL	1,38	https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.120916
G7	Japan	Odrasli	Serum	ng/mL	2,1	https://doi.org/10.1539/joh.12-0264-OA
G8	Južna Koreja	Odrasli	Serum	ng/mL	2,85	https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.06.005
G9	Kanada	Odrasli	Serum	ng/mL	1,8	https://doi.org/10.1186/s12940-025-01165-8
O1	Kina	Odrasli	Serum	ng/mL	537	https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00778
O2	Belgija i SAD	Odrasli	Serum	ng/mL	1100	https://doi.org/10.1007/s00420-007-0213-0
O3	Norveška	Odrasli	Serum	ng/mL	57	https://doi.org/10.1021/es102033k
O4	Švedska	Odrasli	Serum	ng/mL	110	https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.09.001
O5	Kina	Odrasli	Serum	ng/mL	1636	https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es300906q

Biografija

Marija Kostić (rođ. Opačić) rođena je 20.05.1997. godine u Loznici, gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne akademske studije, smer Diplomirani biolog, modul Molekularni biolog, upisala je 2016. godine na PMFUNS, a završila je 2020. godine sa prosečnom ocenom 9,31. Iste godine upisala je Master akademske studije na PMFUNS, smer Master biolog, modul Fiziologija životinja, a završila je 2021. godine sa prosečnom ocenom 10,00.

Doktorske akademske studije, smer Molekularni biolog, upisala je 2021. godine na PMFUNS. Od 2022. godine je zaposlena u zvanju istraživač-pripravnik, a potom od 2024. godine u zvanju istraživač-saradnik u okviru Laboratorije za ispitivanje endokrinih ometača i ćelijsku signalizaciju (ENDOS) na Departmanu za biologiju i ekologiju PMFUNS. Doktorsku disertaciju je uradila pod mentorstvom dr Bojane Stanić, naučnog savetnika, u sklopu Programa Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija kojim se finansira nauka u naučnoistraživačkim organizacijama u Srbiji i projekta „Integration of Biological Responses and PBTK Modeling in Chemical Toxicity Assessment: A Case Study of Perfluorooctanoic Acid (PFOA)", akronim ToxIN, #7010, finansiranog od strane Fonda za nauku Republike Srbije, poziv PRIZMA, u čiju realizaciju je bila uključena. Sve ispite predviđene programom doktorskih studija položila je sa prosečnom ocenom 10,00.

Član je Srpskog biohemijskog društva i Srpskog biološkog društva. Do sada je objavila pet radova u časopisima međunarodnog značaja, od kojih dva kao prvi autor, a učestvovala je i sa šest saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima. Dobitnica je godišnje nagrade za mladog saradnika sa Departmana za biologiju i ekologiju PMFUNS koji je u koautorstvu objavio rad u časopisu sa najvećim IF (2024.), kao i nagrade za mladog saradnika koji je kao prvi autor objavio rad u časopisu sa najvećim IF (2025.). Bila je uključena u realizaciju praktične nastave iz predmeta Uporedna fiziologija životinja, Fiziologija životinja 2, Biologija ćelije i Biologija ćelije i tkiva, kao i u izradi eksperimentalnog dela završnih radova studenata.

Plan tretmana podataka

Naziv projekta/istraživanja
Uticaj perfluorooktanske kiseline i perfluorooktansulfonata na funkciju vaskularnih endotelnih ćelija čoveka u uslovima *in vitro*
Naziv institucije/institucija u okviru kojih se sprovodi istraživanje
Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
Naziv programa u okviru kog se realizuje istraživanje
Doktorske studije, Doktor nauka – molekularna biologija
1. Opis podataka
1.1. Vrsta studije **Eksperimentalna laboratorijska studija u uslovima *in vitro*, zasnovana na modelu makrovaskularnih endotelnih ćelija čoveka (kontinuirana ćelijska linija EA.hy926), sa ciljem ispitivanja efekata perfluoroktansulfonata (PFOS) i perfluoroktanske kiseline (PFOA) na funkcijske i transkriptomske promene, kao i njihove kvantitativne translacije u procenu rizika primenom integrisanog *in vitro–in silico* pristupa. Ćelije su izlagane odabranim mikromolarnim koncentracijama PFOS i PFOA (1, 10 i 100 µM) tokom 48 h, u cilju detekcije ranih molekulskih i ćelijskih odgovora. Nakon izlaganja, praćeni su funkcijski parametri endotela (vjabilnost, apoptoza/nekroza, ćelijski ciklus, migracija, adhezija, angiogeneza, propustljivost, ROS i NO), kao i ekspresija odabranih gena i proteina. Pored toga, sprovedeno je sekvenciranje iRNK (RNA-Seq) korišćenjem platforme DNBSEQ™, radi identifikacije diferencijalno eksprimiranih gena i analize funkcionalnih bioloških procesa. Transkriptomski podaci su dalje korišćeni za modelovanje koncentraciono-zavisnih odgovora, nakon čega je izvršena translacija u ekvivalentne doze za čoveka (HED) primenom toksikokinetičkog modelovanja zasnovanog na fiziologiji čoveka. Na osnovu dobijenih vrednosti HED-ova sprovedena je procena rizika kroz izračunavanje bioaktivnog odnosa izloženosti u opštim i profesionalno izloženim populacijama. Ovakva postavka studije omogućava integraciju eksperimentalnih i modelovanih podataka i povezivanje ranih molekulskih odgovora sa realnim scenarijima izloženosti kod ljudi, čime se obezbeđuje savremeni i translacioni okvir za procenu rizika PFAS.**

1.2. Vrste podataka

a) kvantitativni – **rezultati funkcionalnih testova (vjabilnost, apoptoza/nekroza, ćelijski ciklus, migracija, adhezija, angiogeneza, propustljivost, ROS i NO), relativna ekspresija gena i proteina (RT-qPCR, Western blot), kao i transkriptomski podaci dobijeni RNA-seq (normalizovani nivoi ekspresije, diferencijslno eksprimirani geni), vrednosti referentnih koncentracija (BMC), ekvivalentnih doza za čoveka (HED) i bioaktivnog odnosa izloženosti (BER)**

b) kvalitativni – **rezultati bioinformatičkih analiza, uključujući funkcionalnu anotaciju diferencijalno eksprimiranih gena (molekulske funkcije, biološki procesi i signalni putevi), kao i interpretaciju rezultata u kontekstu dostupne naučne literature**

1.3. Način prikupljanja podataka

a) ankete, upitnici, testovi: **Ne**

b) kliničke procene, medicinski zapisi, elektronski zdravstveni zapisi: **Ne**

c) genotipovi: **Ne**

d) administrativni podaci: **Ne**

e) uzorci tkiva: navesti vrstu **Kontinuirana ćelijska linija makrovaskularnih endotelnih ćelija čoveka (EA.hy926)**

f) snimci, fotografije: **Mikroskopske slike ćelija (svetlosna i fluorescentna mikroskopija)**

g) tekst: **Eksperimentalni protokoli, laboratorijski zapisi i tekstualni izlazi analiza**

h) mapa: **Ne**

i) ostalo: **Kvantitativni eksperimentalni podaci dobijeni nakon *in vitro* izlaganja EA.hy926 ćelija PFOS i PFOA (1, 10 i 100 μM; 48 h), uključujući funkcijske parametre (vjabilnost, apoptoza/nekroza, ćelijski ciklus, migracija, adhezija, angiogeneza, propustljivost, ROS i NO), kao i molekulske podatke (ekspresija gena i proteina). Transkriptomski podaci generisani su metodom RNA-seq (platforma DNBSEQ™), nakon čega su analizirani primenom bioinformatičkih alata radi identifikacije diferencijalno eksprimiranih gena i funkcionalnih procesa. Dodatno, podaci su prošireni *in silico* analizama, uključujući modelovanje referentnih koncentracija, translaciju u ekvivalentne doze za čoveka primenom toksikokinetičkog modelovanja zasnovanog na fiziologiji čoveka i procenu rizika kroz izračunavanje bioaktivnog odnosa izloženosti.**

1.4. Format podataka, upotrebljene skale, količina podataka

1.4.1. Upotrebljeni softver i format datoteke:

Podaci su generisani, obrađivani i arhivirani primenom različitih softverskih alata, u standardizovanim formatima koji omogućavaju dugoročno čuvanje i razmenu podataka:

a) Excel datoteke (.xlsx) **– tabelarni prikaz eksperimentalnih i modelovanih podataka**

b) Tekstualne datoteke (.txt, .csv) **– izlazni podaci RNA-seq analiza i bioinformatičkih alata**

c) PDF datoteke (.pdf) **– izveštaji**

d) Dokument datoteke (.docx) **– tekstualni opisi i obrada podataka**

e) Slikovni formati (.jpg, .tiff) **– mikroskopske slike i grafički prikazi rezultata**

f) Formati podataka dobijeni protočnom citometrijom **– sirovi podaci nakon akvizicije (.rif; raw image data file), podaci za korekciju spektralnog preklapanja (.cif; compensation file), analizirani podaci (.daf ; data analysis file)**

g) Specijalizovani izlazni formati softvera **– BMDExpress, PBTK modeli, ShinyGO**

1.4.2. Broj zapisa (kod kvantitativnih podataka)

a) broj varijabli: **veliki broj varijabli (više desetina funkcionalnih parametara i više hiljada gena u RNA-seq analizi)**

b) broj merenja: **veliki broj merenja, uključujući biološka i tehnička ponavljanja za sve eksperimentalne uslove**

1.4.3. Ponovljena merenja

a) Da

Ukoliko je odgovor da, odgovoriti na sledeća pitanja:

a) vremenski razmak između ponovljenih merenja: **merenja su vršena nakon 48 h izlaganja, uz više tehničkih i bioloških ponavljanja u istom vremenskom trenutku; ponavljanje merenja posle 7 dana**

b) varijable koje se više puta mere odnose se na: **sve funkcijske i molekulske parametre (vjabilnost, apoptoza/nekroza, ćelijski ciklus, migracija, adhezija, angiogeneza, propustljivost, ROS i NO, ekspresija gena i proteina), kao i transkriptomske podatke**

c) nove verzije fajlova koji sadrže ponovljena merenja su imenovane: **u skladu sa eksperimentalnim uslovima (tip supstance, koncentracija, replikat, datum merenja)**

Napomene: **Podaci su strukturirani i arhivirani na način koji omogućava njihovu reproduktivnost, ponovnu analizu i dalju primenu u istraživanjima i proceni rizika.**

Da li formati i softver omogućavaju deljenje i dugoročnu validnost podataka?

a) Da

2. Prikupljanje podataka

2.1. Metodologija za prikupljanje/generisanje podataka

2.1.1. U okviru kog istraživačkog nacrta su podaci prikupljeni?

a) eksperiment: ***in vitro***

b) korelaciono istraživanje: **Ne**

c) analiza teksta: **Ne**

d) ostalo: **transkriptomska analiza (RNA-Seq) i bioinformatička obrada podataka, kao i *in silico* modelovanje (BMC, PBTK, HED, BER) i analiza literaturnih podataka**

2.1.2. Navesti vrste mernih instrumenata ili standarde podataka specifičnih za određenu naučnu disciplinu (ako postoje).

U istraživanju su korišćeni savremeni laboratorijski i analitički instrumenti, uključujući: svetlosni i fluorescentni mikroskop, automatski brojač ćelija (Luna-II™), fluorimetar, spektrofotometar, protočni citometar, sistem za vizualizaciju proteina (myECL Digital Imaging System), PCR (Veriti Thermal Cycler) i qRT-PCR (Eppendorf) uređaji. Sekvenciranje iRNK izvršeno je primenom platforme DNBSEQ™, u skladu sa standardima visokopropusnog sekvenciranja. Za analizu podataka korišćeni su relevantni bioinformatički i statistički alati (npr. ShinyGO, BMDExpress), kao i PBTK modeli (*httk* paket u R okruženju i GastroPlus™).

2.2. Kvalitet podataka i standardi

2.2.1. Tretman nedostajućih podataka

a) Da li matrica sadrži nedostajuće podatke? **Ne**

Svi podaci prikupljeni u okviru eksperimentalnog i *in silico* dela istraživanja su kompletni i ne sadrže nedostajuće vrednosti.

2.2.2. Na koji način je kontrolisan kvalitet podataka? Opisati

Kvalitet podataka obezbeđen je primenom standardizovanih laboratorijskih protokola, korišćenjem validiranih metoda i instrumenata, kao i uključivanjem odgovarajućih kontrolnih grupa u svim eksperimentima. Sva merenja su izvršena u više bioloških i tehničkih ponavljanja, čime je smanjena varijabilnost i povećana pouzdanost rezultata. Transkriptomski podaci podvrgnuti su standardnim procedurama kontrole kvaliteta (normalizacija podataka, filtriranje i statistička analiza), dok je pouzdanost identifikovanih razlika u ekspresiji gena potvrđena primenom odgovarajućih statističkih testova. Dobijeni rezultati su dalje upoređeni sa relevantnim podacima iz naučne literature, čime je obezbeđena njihova biološka i naučna validnost.

2.2.3. Na koji način je izvršena kontrola unosa podataka u matricu?

Kontrola unosa podataka sprovedena je kroz višestepenu proveru, koja uključuje ručnu validaciju unetih vrednosti, poređenje sa originalnim eksperimentalnim zapisima, kao i logičku i statističku proveru konzistentnosti podataka. Organizacija podataka u tabelarnim formatima izvršena je na standarizovan način, uz jasno definisane nazive varijabli, eksperimentalne uslove i oznake replikata, što omogućava laku proveru, reproduktivnost i ponovnu analizu podataka.

3. Tretman podataka i prateća dokumentacija

3.1. Tretman i čuvanje podataka

3.1.1. Podaci će biti deponovani u

Digitalnu bazu doktorskih disertacija u Srbiji – Nacionalni repozitorijum doktorskih disertacija (NaRDUS), kao i u institucionalni repozitorijum Univerziteta u Novom Sadu (CRIS). Ovi repozitorijumi obezbeđuju dugoročno čuvanje, vidljivost i dostupnost naučnih rezultata.

3.1.2. URL adresa

https://nardus.mpn.gov.rs/

https://cris.uns.ac.rs/sr/thesis-library/public-dissertations

3.1.3. Da li će podaci biti u otvorenom pristupu?

a) Da

3.2. Metapodaci i dokumentacija podataka

3.2.1. Koji standard za metapodatke će biti primenjen?

Opisni standard metapodataka, u skladu sa zahtevima repozitorijuma (NaRDUS i CRIS), koji obuhvata osnovne bibliografske i tehničke informacije o podacima.

3.2.2. Navesti metapodatke na osnovu kojih su podaci deponovani u repozitorijum.

Metapodaci obuhvataju: ime i prezime autora, naslov doktorske disertacije, instituciju i program doktorskih studija, apstrakt i ključne reči, godinu odbrane, tip i format podataka, opis metodologije (eksperimentalni i *in silico* pristup), nazive i opise skupova podataka, softver i alate korišćene u obradi podataka, uslove pristupa i licencu korišćenja.

3.3. Strategija i standardi za čuvanje podataka

3.3.1. Do kog perioda će podaci biti čuvani u repozitorijumu? **Trajno**

3.3.2. Da li će podaci biti deponovani pod šifrom? **Ne**

3.3.3. Da li će šifra biti dostupna određenom krugu istraživača? **Ne**

3.3.4. Da li se podaci moraju ukloniti iz otvorenog pristupa posle izvesnog vremena? **Ne**

Podaci ne sadrže lične ili poverljive informacije, već su generisani u okviru laboratorijskog *in vitro* istraživanja. Shodno tome, ne postoje pravna, etička ili bezbednosna ograničenja koja bi zahtevala ograničenje pristupa ili uklanjanje podataka. Otvoreni pristup je u skladu sa principima transparentnosti, reproduktivnosti i ponovne upotrebe naučnih podataka.

4. Bezbednost podataka i zaštita poverljivih informacija

Ovaj odeljak MORA biti popunjen ako vaši podaci uključuju lične podatke koji se odnose na učesnike u istraživanju. Za druga istraživanja treba takođe razmotriti zaštitu i sigurnost podataka.

4.1. Formalni standardi za sigurnost informacija/podataka

Istraživači koji sprovode ispitivanja s ljudima moraju da se pridržavaju Zakona o zaštiti podataka o ličnosti *(https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)* i odgovarajućeg institucionalnog kodeksa o akademskom integritetu.

4.1.1. Da li je istraživanje odobreno od strane etičke komisije? **Ne**

4.1.2. Da li podaci uključuju lične podatke učesnika u istraživanju? **Ne**

5. Dostupnost podataka

5.1. Podaci će biti

a) javno dostupni

Napomena: **Na zahtev zainteresovanih istraživača, originalni podaci (npr. neobrađeni ili prošireni skupovi podataka) mogu biti dodatno dostavljeni u elektronskoj formi, uz prethodnu komunikaciju sa autorom, uz dostavljeno pismeno odobrenje nadležne osobe za podatke.**

5.2. Navesti licencu pod kojom će prikupljeni podaci biti arhivirani.

Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

6. Uloge i odgovornost

6.1. Navesti ime i prezime i mejl adresu vlasnika (autora) podataka

Marija Kostić, marija.opacic@dbe.uns.ac.rs

6.2. Navesti ime i prezime i mejl adresu osobe koja održava matricu s podacima

Marija Kostić, marija.opacic@dbe.uns.ac.rs

6.3. Navesti ime i prezime i mejl adresu osobe koja omogućuje pristup podacima drugim istraživačima

Marija Kostić, marija.opacic@dbe.uns.ac.rs