

Priloga 1: Pregled raziskav epigenetskega vpliva kemičnih motilcev endokrinega sistema (KMES) pri živalih.

KMES	Izpostavljenost	Epigenetski učinek KMES	Organizem	Referenca
		Metilacija DNA		
Vinklozolin	Vinklozolin 100 mg/kg TT/d brejim podganam (F0) med 8. in 15. dnevom gestacije (intraperitonealna injekcija).	Pri F3 generaciji spremenjena metilirana področja DNA v promotorskih regijah granuloznih celic, kar preko ncRNA vpliva na izražanje genov, povezanih s PCOS.	podgane (Sprague Dawley)	Nilsson et al. 2012 (74)
Vinklozolin	Intraperitonealna injekcija Vinklozolina 100 mg/kg/d med 8. in 15. dnevom gestacije.	Brez transgeneracijskega vpliva na plodnost (spermatogenezo) in status metilacije DNA po izpostavljenosti.	podgane (Sprague Dawley)	Inawaka et al. 2009 (41)
		ncRNA in metilacija DNA		
Vinklozolin, DDT	Vinklozolin 100 mg/kg TT/d in DDT 25 mg/kg TT/d brejim podganam med 8. in 15. dnevom gestacije (intraperitonealna injekcija).	Pri F3 generaciji: - spremenjeno izražanje lncRNA, sncRNA in mRNA - različno metilirane regije: 164 pri vinklozinu in 293 pri DDT izpostavljenosti.	podgane (Sprague Dawley)	Nilsson et al. 2018 (75)
		Metilacija DNA		
BPA	<i>In vitro:</i> - Embriji, izpostavljeni f 50µM koncentraciji BPA za 72 ur (morule) in 96 ur (blastociste); - celice embrionalnega teratokarcinoma (celična linija F9); - humana celična linija HEK293. <i>In vivo:</i> - 40 mg/kg TT enkratna intraperitonealna injekcija brejim mišim (1. dan nosečnosti).	Po izpostavljenosti BPA: - znižana stopnja metilacije DNA v embrijih (<i>in vitro in vivo</i>); - zmanjšanje stopnje metilacije asimetričnih sestrskih kromatid (AMSC) v blastocistah (<i>in vitro in vivo</i>) in v celicah F9.	miši (CBA x C57BL)	Patkin et al. 2017 (99)
BPA	20 µg/L BPA za 4 tedne.	Povzročila hipermetilacijo promotorja gena za AMH v generacijah F1, F2 in F3.	riba cebrica (<i>Danio rerio</i> , divji tip)	Santangeli et al. 2019 (60)
BPA	0.01, 0.1 in 1 mg/L BPA za 15 dni.	- Zmanjšano izražanje dnmt1 pri okoljskih koncentracijah BPA (0.1 mg/L); - zmanjšanje celokupne stopnje metilacije DNA v jajčnikih po izpostavljenosti 1mg/l BPA.	Riba cebrica (<i>Danio rerio</i>)	Laing et al. 2016 (61),
BPA	10 mg/kg TT/d (višji odmerek) in 10 µg/kg TT/d (nižji odmerek) 2 tedna pred zanositvijo in do embrionalnega dne (E) 9.5 in 12.5.	- Spremenjena metilacija vtisnjenih genov v zarodku in posteljici pri fiziološko relevantnih odmerkih BPS (10 µg/kg TT/d), z izrazitejšimi spremembami v posteljici. - Izpostavljenost BPA zunaj embrionalnega časa epigenetskega reprogramiranja (od E5.5 do E12.5) ni povzročila značilnih sprememb v genskem vtisnjenju.	miši C57BL/6 (B6; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) in B6 (CAST7) ali C7 vrste: - E9.5 in E12.5 stari zarodki in posteljice	Susiarjo et al. 2013 (100)
BPA	Dieta AIN-93G brez fitoestrogenov z dodatkom 50 mg BPA/kg pred zanositvijo, med nosečnostjo in laktacijo.	Maternalna izpostavljenost BPA je pri zarodku povzročila zmanjšanje metilacije v genu <i>Agouti</i> in v <i>Cabp1AP</i> . Prehranski dodatki z metilnimi donorji, kot je folna kislina ali fitoestrogeni (genistein) je ublažila hipometilacijski učinek BPA.	rumena miš <i>agouti</i>	Dolinoy et al. 2007 (101)
BPA	7- in 35-dnevna izpostavljenost BPA v koncentracijah 15 in 225 µg/L.	Zmanjšana stopnja globalne metilacije DNA in različne spremembe v transkripciji genov <i>Dnmts</i> , <i>Gnmt</i> in <i>Tets</i> v jajčnikih.	riba cebrica (<i>Danio rerio</i>)	Liu et al. 2016 (103)
BPA	Izpostavljenost BPA v koncentracijah 0, 40, 80 in 160 mcg BPA/kg TT/d celotno nosečnost.	Spremenjena metilacija DNA vtisnjenih genov v germinalnih celicah ploda in v posteljici.	breje miši CD-1	Zhang et al. 2012 (104)
BPA	Izpostavljenost BPA v koncentracijah 0, 20 in 40 g/kg TT: - dnevno med 1. in 14. postnatalnim dnevom (PND) (skupina 1); - vsak 5. dan med 5. in 20. PND (skupina 2).	Inhibicija metilacije vtisnjenih genov in zato povečano izražanje ER, kar pospeši atrezijo primitivnih folikulnih celic in inhibicijo zorenja oocitov.	miši CD-1	Chao et al. 2012 (102)

KMES	Izpostavljenost	Epigenetski učinek KMES	Organizem	Referenca
		ncRNA		
BPA	Dnevne podkožne injekcije BPA 0,5 mg/kg med 30. in 90. dnem gestacije (rok ~147 dni). Uporabljeni odmerek BPA izbran, da povzroči krvno koncentracijo BPA (~5 ng/mL), podobno srednji vrednosti meritev BPA v krvi žensk v ZDA.	Fetalno izražanje miRNA v jajčnikih je spremenjeno, kar povzroči supresijo izražanja genov (družine Sox, kit ligand in z inzulinom povezanih genov).	breje ovce vrste Suffolk, stare 2–3 leta	Veiga-Lopez et al. 2013 (66)
BPA, BPS	Izpostavljenost fiziološko relevantnim odmerkom za 24 ur: - BPA – 0,05 mg/mL; ali - BPS – 0,05 mg/mL.	- BPA poveča izražanje miR-21, miR-155 in miR-29a ter zmanjša izražanje miR-34c in miR-10b v kravjih jajčnih celicah; - BPS ni vplival na izražanje vseh 6 preučevanih miRNA ob odmerku LOAEL; - BPA ni vplival na 4 od preučevanih miRNA ob odmerku LOAEL v kravjih zarodkih.	<i>In vitro</i> model zrelih kravjih jajčnih celic (kompleksov kumulusa in jajčnih celic), zarodkov in kulture celic kumulusa (vrsta <i>Bos taurus</i>)	Sabry et al. 2021 (65)
BPA	Izpostavljenost BPA v vodi v 3 različnih odmerkih: -25 µg/L (ocenjeni odmerek 0,23 µg/kg TT/d); -250 µg/L (ocenjeni odmerek 2,50 µg/kg TT/d); -2,5 mg/L (ocenjeni odmerek 23,58 µg/kg TT/d); med gestacijo.	Pri mladičih prenatalna izpostavljenost BPA poveča izražanje miR-224 v granulosa celicah in s tem poveča raven estradiola v serumu, zniža ravni FSH in vpliva na plodnost.	podgane (Wistar)	Lite et al. 2019 (64)
		Modifikacije histonov		
BPA	Kontrolna in 3 izpostavljene skupine: - 5, - 10, in - 20 µg/L BPA (za 3 tedne).	Motena maturacija in stimulirana apoptoza zrelih foliklov preko sprememb v modifikaciji histonov.	riba cebrica (<i>Danio rerio</i> , AB divji tip)	Santangeli et al. 2016 (62)
DES	Subkutana injekcija DES 1 mg/kg/d od 1. do 5. postnatalnega dne	Spremenjene epigenetske oznake (H4K5ac in H3K4me3) na lokusu Six1	miši CD-1	Jefferson et al. 2013 (76)
		Metilacija DNA		
MXC	20 µg/kg/d (nizek odmerek MXC) ali 100 mg/kg/d (visok odmerek MXC) za 12 dni med E19 do PND7.	Razvojna izpostavljenost MXC je povzročila hipermetilacijo promotorskih regij ER beta.	podgane (Fischer, CDF)	Zama et al. 2009 (43)
DEHP	40 lg/kg in 0,1 % DMSO od 0,5 do 18,5 dneva po zanositvi.	Zmanjša metilacijo vtisnjenih genov v oocitih.	miši CD-1	Li et al. 2014 (70)
TCDD	100 ng/kg/d ali 500 ng/kg/d med 8–14 dnem gestacije.	Maternalna izpostavljenost je povzročila: - aberantne koncentracije E2 in FSH; - zmanjšano število primordialnih in sekundarnih foliklov ter rumenih telesov; - zmanjšanje izražanja mRAN vtisnjenih genov <i>Igf2</i> in <i>H19</i> ; - zmanjšano izražanje proteina IGF2; - brez sprememb v povprečni metilacijski stopnji <i>Igf2</i> DMR2 in <i>H19</i> ICR; - samo nekaj mest CpG je hipermetiliranih ob izpostavljenosti visokim odmerkom TCDD.	podgane (Sprague Dawley)	Zhang et al. 2019 (68)
TCDD	Inkubacija enoceličnega zarodka do stopnje blastociste v 10nM TCDD.	Višja stopnja metilacije 430 baznih parov <i>H19/Igf2</i> kontrolne regije vtisnjenja in aktivnosti metiltransferaz pri izpostavljenih zarodkih.	miši Jcl:ICR	Wu et al. 2004 (69)
		Modifikacije histonov		
CD	100 µg/kg/d med E6.5 do E15.5 (embrionalno obdobje diferenciacije somatskih celic v germinalna tkiva).	Jajčne celice mišjih zarodkov: povečanje H2Aub in H3K27me3 ter zmanjšanje H4ac in H3K4me3. Jajčne celice odraslih miši: zmanjšanje H3K4me3 in H4ac v skupini izpostavljeni CD.	miši Swiss	Legoff et al. 2019 (77)

KMES	Izpostavljenost	Epigenetski učinek KMES	Organizem	Referenca
		Natančni epigenetski mehanizem neznan		
DHEP	20 µg/kg/d, 200 µg/kg/d, 200 mg/kg/d, 500 mg/kg/d ali 750 mg/kg/d od 10,5 dneva gestacije do rojstva.	Moti folikulogenezo, steroidogenezo in povzroča ciste jajčnika pri več generacijah; natančni epigenetski mehanizem še ni znan; multigeneracijski učinek naj bi bil povzročen preko <i>Esr1</i> in peroksisom aktiviranega receptorja alfa.	miši CD1	Rattan et al. 2018 (71)
DHEP	Približno 80 mg/kg/d preko treh generacij miši.		Miši (WT in PPAR izločena – »knockout«)	Kawano et al. 2014 (72)
DHEP, B[a]P Benzo[a]pyrene	Vsak drugi dan 60 dni: - B[a]P 5mg/kg - DEHP 300mg/kg; - B[a]P 5mg/kg + DEHP 300mg/kg; - B[a]P 10mg/kg - DEHP 600mg/kg; - B[a]P 10mg/kg + DEHP 600 mg/kg/TT. Vnos v prebavila.		Miši (Sprague Dawley)	Xu et al. 2010 (73)
DEHP	20 µg/kg/d, 200 µg/kg/d, 500 mg/kg/d ali 750 mg/kg/d) od 11. dneva gestacije do rojstva.		miši CD1	Brehm et al. 2018 (105)

Legenda: KMES – kemični motilci endokrinega sistema; DNA – deoksiribonukleinska kislina; RNA – ribonukleinska kislina; ER – estrogenski receptor; AMSC – nesimetrično metilirane sestrsk kromatide (*angl.* asymmetric methylated sister chromatids); CpG – citozin, ki mu sledi gvanin v linearnem zaporedju baz v 5' → 3' smeri; ncRNA – nekodirajoča ribonukleinska kislina; E2 – estradiol; FSH – folikle stimulirajoči hormon; LH – luteinizirajoči hormon; DES – dietilstilbestrol; BPA – bisfenol A; Tet – *angl.* Tet Methylcytosine Dioxygenase gene; H3K4 – četrti lizinski ostanek na beljakovini histon 3; H4K5ac – acetilacija 5. lizinskega ostanka na histone 4; H3K4me3 – trimetilacija na 4. lizinskem ostanku histone 3; DNMT – DNA metiltransferaza; MEHP – mono (2-etilheksil) ftalat; MXC – metilklor; Esr1 – *angl.* gene estrogen receptor 1; DHEP – Bis (2-etilheksil) phtalat; PCOS – sindrom policističnih jajčnikov; AMH – antimuellerjev hormon; Gnmt – gen za encim glicin N-metiltransferazo; Igf2 – gen za inzulinu podobni rastni faktor 2; H19 – *angl.* H19 imprinted maternally expressed transcript gene; DMR2 – različno metilirana regija 2 (*angl.* differentially methylated region 2); H19-ICR – H19/IGF2 kontrolna regija za vtisnjenje (*angl.* H19/IGF2 Imprinting Control Region); TCDD – 2,3,7,8 Tetraklorodibenzen-p-dioksin; Six 1 – *angl.* gene sine oculis homeobox homolog 1; CDK5 – od ciklina odvisna kinaza 5; CD – Klordekon; H2Aub – monoubikvitinacija na histonu 2A; H3K27me3 – trimetilacija lizinskega ostanka 27 na histonu H3; H4 ac – histon H4 pan-acetil; H3K4me3 – trimetilacija lizina 4 na histone 3; Sox – *angl.* SRY-box transcription factors gene; CabpIAP – *angl.* Cdk5-activator binding protein; ncRNA – nekodirajoča ribonukleinska kislina; lncRNA – dolga nekodirajoča ribonukleinska kislina; sncRNA – majhna nekodirajoča ribonukleinska kislina; miRNA – mikro ribonukleinska kislina; DDT – dikloro-difenil-trikloroetan; E – embrionalni dan; LOAEL – *angl.* lowest observed adverse effect level; PND – dan po rojstvu (*angl.* postnatal day); B[a]P – Benzo[a]piren; DEHP – bis 2-etilheksil ftalat; DBP – dibutil ftalat.

Priloga 2: Pregled raziskav epigenetskega vpliva kemičnih motilcev endokrinega sistema (KMES) pri ljudeh.

KMES	Izpostavljenost in vzorci	Epigenetski učinek KMES	Organizem	Referenca
		DNA metilacija		
MEHP	Materina in popkovnična kri, odvzeti ob porodu. Srednja koncentracija MEHP v maternalni krvi 10,3 ng/mL (interkvartilni interval: 5,8–15,3 ng/mL), s 100-odstotno stopnjo zaznavanja.	Prenatalna izpostavljenost DHEP, povezana s spremenjeno metilacijo DNA v genih, povezanih s metabolizmom, endokrinim sistemom in prenosom celičnega signala.	203 pari novorojenček-mama. Stopnja metilacije DNA, določena iz popkovnične krvi.	Miura et al. 2021 (85)
DEHP	Materin urin in popkovnična kri. Koncentracije ΣMEHP v materinem urinu: 6,48–1.561 µg/g kratinin-1.	Metilacija 25 CpG mest, povezana s prenatalno izpostavljenostjo DEHP; GSEA je pokazala povezavo med geni z metilacijskimi spremembami in geni, vključenimi v estrogeni in androgeni odgovor.	64 parov novorojenček-mama; Stopnja metilacije DNA, določena v popkovnični krvi.	Chen et al. 2018 (86)
20 različnih metabolitov ftalatov	Materin urin pri 13. in 26. tednu nosečnosti. (stopnja detekcije: od 90 % za MEHP do 99,7 % za MEP) Srednja vrednost pri 13. t.n. (µg/g kreatinina): - ΣLMW 220,2 (107,0–533,9) - ΣDEHP: 45,7 (27,8–84,8) - ΣHMW: 66,0 (37,4–107) Srednja vrednost pri 26. t.n. (µg/g kreatinina): - ΣLMW: 224,6 (114,7–476,4) - ΣDEHP: 59,5 (35,3–104,6) - ΣHMW: 81,3 (48,8–130,2).	Izpostavljenost ftalatom povzročila zmanjšanje metilacije <i>Alu</i> ponovitev in <i>LINE-1</i> (popkovnična kri) in zmanjšanje metilacije <i>Alu</i> ponovitev (pri 9-letnih otrocih).	355 parov mama-novorojenček, stopnja DNA metilacije določena iz popkovnične krvi novorojenčkov in polne krvi teh otrok v starosti 9 let.	Huen et al. 2016 (81)
8 različnih ftalatov in 4 metabolite ftalatov	Materin urin pri 13. in 26. tednu nosečnosti. Povprečna srednja vrednost ob meritvah (µg/g kreatinina): - ΣLMW: 268,98; - ΣDEHP: 56,33; - ΣHMW: 77,56.	Spremenjena metilacija regij, ki vsebujejo gene, ki so vključeni v imunski odgovor (<i>IRAK4</i> , <i>ESM1</i>), kancerogenezo (<i>BRCA1</i> , <i>LASP1</i>), endokrini sistem (<i>CNPY1</i>), moško plodnost (<i>IFT140</i> , <i>TESC</i> , <i>PRDM8</i>).	336 parov novorojenček-mama. Stopnja DNA metilacije določena iz popkovnične krvi.	Solomon et al. 2017 (84)
BPA in mešanica ftalatov	Vzorec materine krvi in urina ob prvem pregledu v nosečnosti (8.–14. t.n.) in popkovnična kri, odvzeta ob porodu. Povprečne vrednosti BPA: - materina kri: 0,57 ng/ml (SD 4,72); - materin urin: 0,78 ng/ml (5,47); - ΣDEHP materin urin: 0,09 nMol (SD 0,11); - ΣDBP materin urin: 0,08 nMol (SD 0,09).	Zmanjšanje metilacije genov LINE-1 ponavljajočih elementov in genov <i>IGF2</i> , <i>PPARA</i> .	116 parov novorojenček-mama, metilacija določena iz popkovnične krvi	Montrose et al. 2018 (82)
Mešanica ftalatov in njihovih metabolitov	Materin urin (v zgodnji in pozni nosečnosti) in popkovnična kri, odvzeta po porodu. Povprečne vrednosti v nosečnosti (µg/g kratinin): MEP 214,2, MBP 24,4, MiBP 2,7, MEHP 3,9, MEHHP 16,1, MEOHP 12,1, MECPP 26,7, ΣDEHP 60,9, MBzP 8,2, MCPP 2,0, MCOP 3,4, MCNP 1,9.	Več različnih različno metiliranih vtisnjenih genov.	296 parov novorojenček-mama. Metilacija določena iz popkovnične krvi.	Tindula et al. 2018 (83)
Mešanica ftalatov in njihovih metabolitov	Materin urin pred 12. t. n. Povprečna koncentracija ftalatov (celokupno): 231 ng/mL (IZ 287–455).	Ugotovljenih 39 različnih genov s pomembno sprememnjeno metilacijo v skupini z najvišjo izpostavljenostjo ftalatom.	49 nosečnic. Metilacija določena v vzorcu posteljice.	Grindler et al. 2018 (79)
		ncRNA		
11 različnih metabolitov ftalatov in 8 različnih fenolov	Materin urin (odvzet ob prvem pregledu (< 16 t.n.) in ob 4 naslednjih pregledih med nosečnostjo). Podane spremembe v metilaciji na logaritem koncentracije.	Zmanjšano izražanje miR-142-3p, miR15a-5p in miR-185 in motnje razvoja posteljice in ploda.	179 nosečnic. Metilacija določena v vzorcu posteljice.	LaRocca et al. 2016 (80)

Legenda: KMES – kemični motilci endokrinega sistema; DNA – deoksiribonukleinska kislina; RNA – ribonukleinska kislina; BPA – bisfenol A; DEHP – Di-2-etilheksil ftalat; MBP – Mono-n-butyl ftalat; MBzP – Monobenzil ftalat; MCNP – Monokarboksionil ftalat; MCOP – Monokarboksiocil ftalat; MCPP – Mono (3-karboksipropil) ftalat; MECPP – Mono (2-ethyl-5-karboksipentil) ftalat; MEHHP – Mono (2-ethyl-5-hidroksiheksil) ftalat; MEHP – Mono (2-ethylheksil) ftalat; MEOHP – Mono (2-ethyl-5-oksoheksil) ftalat; MEP – Monoetil ftalat; MiBP – Mono-izobutil ftalat; CpG – 5'–C–fosfat–G–3'; GSEA – *angl.* gene-set enrichment analysis; LINE-1: *angl.* Long Interspersed Element-1mobile DNA; *Alu* ponovitve – za primate specifične ponavljajoči DNA elementi; *IRAK4* – *angl.* interleukin 1 receptor associated kinase 4 gene; *ESM1* – *angl.* endothelial Cell Specific Molecule 1 gene; *BRCA1* – *angl.* breast cancer gene 1; *LASP1* – *angl.* LIM And SH3 Protein 1 gene; *CNPY1* – *angl.* Canopy FGF Signaling Regulator 1 gene; *IFT140* – *angl.* intraflagellar transport 140 gene; *TESC* – *angl.* Testicularis gene; *PRDM8* – *angl.* PR/SET Domain 8 gene; *IGF2* – *angl.* insulin like growth factor 2 gene; *PPARA* – *angl.* peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene; ΣDEHP – povzetek meritev di(2-ethylheksil) ftalat; ΣLMW – povzetek meritev ftalatov z nizko molekularno težo (MEP – monoetil ftalat) (*angl.* summary measurements of low molecular weight phthalates); MBP – mono-n-butyl ftalat; MiBP – mono-izobutil ftalat; ΣHMW – povzetek meritev ftalatov z visoko molekularno težo (MEHP – mono (2-ethylheksil) ftalat) (*angl.* summary measurements of high molecular weight phthalates); MEHHP – mono (2-ethyl-5-hidroksiheksil) ftalat; MEOHP – mono (2-ethyl-5-oksoheksil) ftalat; MECPP – mono (2-ethyl-5-karboksipentil) ftalat; SD – standardni odklon.