

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Biologie

B-BI



UNIVERZITA
KARLOVA

Anna Štenglová

Endokrinní disruptory a jejich vliv na vývojovou kompetenci savčího oocytu
Endocrine disruptors and their impact on mammalian oocyte developmental competence

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Lucie Němcová, Ph.D.

Praha, 2024

Charles University

Faculty of Science

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce Ing. Lucii Němcové Ph.D. za odborné vedení práce, její čas a zejména za trpělivost. Za podporu při psaní této práce bych ráda poděkovala své rodině a speciálně děkuji tátovi.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně z uvedené literatury a na základě konzultací se školitelkou. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Praha 2024

Abstrakt

Endokrinní disruptory (EDs) jsou definované jako látky exogenního původu ovlivňující působení hormonů. EDs se vyskytují ve významném množství v přírodním prostředí, plastových produktech, zpomalovačích hoření, což vede k nevyhnutelné expozici. Díky jejich širokému působení vzniklo několik organizací a úmluv s cílem regulovat jejich výskyt v přírodním prostředí a omezit, popřípadě eliminovat jejich výrobu. Po vstupu do organismu ovlivňují nepříznivě prostřednictvím hormonů vývoj, reprodukční, nervovou nebo imunitní soustavu více tříd živočichů. Modifikované hormonální hladiny jsou kromě zhoršené fertility spojené také s fyziologickými abnormalitami, osteoporózou, depresí nebo s metabolickými onemocněními. EDs ovlivňují samičí reprodukční systém hormonálními modifikacemi osy hypothalamus-hypofýza-gonády, v některých případech dokonce vedoucími až k dřívějšímu nástupu puberty. Pod vlivem EDs lze pozorovat narušení procesu steroidogeneze, vývoje folikulů a oocytů zejména prostřednictvím meiotických defektů, což může vyústit až k předčasnému ovariálnímu selhání, popřípadě k infertilitě. Řada endokrinních disruptorů narušuje reprodukční soustavu žen i po více generací epigenetickými efekty. Tato práce shrnuje poznatky o těchto všudypřítomných chemikáliích a jejich působení na samičí reprodukční systém, se zaměřením na vývojovou kompetenci savčího oocyty.

Klíčová slova

endokrinní disruptory, oocyt, hormony, embryo, expozice

Abstract

Endocrine disruptors (EDs) are defined as substances of exogenous origin that disrupt endocrine system. EDs are found in significant amounts in the natural environment, plastic products and flame retardants, leading to unavoidable exposure. Due to their broad effects, several organizations and conventions aim to regulate their presence in the natural environment and limit, or even eliminate their production. By entering the body, they negatively affect development, reproductive, nervous or immune systems of various animal classes through hormones. Modified hormonal levels are associated not only with impaired fertility, but also with physiological abnormalities, osteoporosis, depression or metabolic diseases. EDs affect the female reproductive system through hormonal modifications of the hypothalamus-hypophysis-gonads axis, which can lead to an earlier pubertal onset in some cases. Under the influence of EDs, impairments can also be observed in the process of steroidogenesis, development of follicles and oocytes, particularly through meiotic defects, which can lead to premature ovarian failure or infertility. Multiple chemicals disrupt the female reproductive system across several generations through epigenetic effects. This work summarizes knowledge about these ubiquitous substances and their impact on female reproductive system, focusing on the developmental competence of mammalian oocytes.

Key words

endocrine disruptors, oocyte, hormones, embryo, exposure

Obsah

Abstrakt

Abstract

Seznam zkratek

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Úvod | 1 |
| 2 | Rozdělení endokrinních disruptorů | 2 |
| 2.1 | Polybromové difenylethery (PBDE) | 2 |
| 2.2 | Polychlorované bifenyly (PCB) | 3 |
| 2.3 | Diethylstilbestrol, DES | 3 |
| 2.4 | 17 α -ethinylestradiol (EE2) | 3 |
| 2.5 | Bisfenol A (BPA) | 4 |
| 2.6 | Ftaláty | 4 |
| 2.7 | Atrazin | 5 |
| 2.8 | Methoxychlor (MXC) | 6 |
| 2.9 | Vinklozolin | 6 |
| 2.10 | Fytoestrogeny | 7 |
| 3 | Endokrinní systém | 8 |
| 4 | Fyziologie ženského reprodukčního systému | 8 |
| 5 | Vývojová kompetence savčího oocytu | 10 |
| 5.1 | Vývoj oocytu | 10 |
| 5.2 | Folikulogeneze | 10 |
| 5.3 | Zrání oocytu | 11 |
| 5.4 | Steroidogeneze | 12 |
| 5.5 | Zralý oocyt | 13 |
| 6 | Působení EDs na organismus | 13 |
| 6.1 | Působení EDs na samičí reprodukční systém | 14 |
| 6.2 | Estrogenní receptory | 14 |
| 7 | EDs: vývojová kompetence savčích oocytů | 15 |
| 7.1 | EDs: steroidogeneze | 15 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 7.2 | EDs: meiotické defekty | 16 |
| 7.3 | EDs: mitochondrie v oocytech | 16 |
| 7.4 | Epigenetický vliv EDs | 17 |
| 7.4.1 | Multigenerační a transgenerační epigenetická dědičnost | 17 |
| 7.4.2 | Epigenetické efekty způsobené EDs v reprodukčním systému | 18 |
| 8 | Regulace EDs v životním prostředí | 18 |
| 8.1 | U.S. EPA | 19 |
| 8.2 | Stockholmská úmluva | 20 |
| 8.3 | OSPAR | 20 |
| 9 | Závěr | 22 |
| 10 | Seznam použité literatury | 24 |

Seznam zkratek

| | |
|-------------|--|
| AHFR | alternativní halogenové zpomalovače hoření |
| AhR | aryl uhlovodíkový receptor |
| ATP | adenosintrifosfát |
| BPA | bisfenol A |
| BPF | bisfenol F |
| BPS | bisfenol S |
| cAMP | cyklický adenosin monofosfát |
| COC | kumulus – oocyt komplex |
| DDT | dichlorodifenyltrichlorethan |
| DEHP | di-2-ethylhexyl ftalát |
| DES | diethylstilbestrol |
| EDs | endokrinní disruptory |
| EE2 | 17 α -ethinylestradiol |
| ER α | estrogenní receptor podjednotky α |
| ER β | estrogenní receptor podjednotky β |
| FSH | folikulostimulační hormon |
| FSHR | receptor folikulostimulačního hormonu |
| GnRH | hormon uvolňující gonadotropiny |
| GnRHR | receptor pro hormon uvolňující gonadotropiny |
| GV | germinální váček |
| hCG | choriový gonadotropin |
| HHG | osa hypothalamus – hypofýza – gonády |
| IARC | mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny |
| LH | luteinizační hormon |
| LHCGR | receptor luteinizačního hormonu a choriového gonadotropinu |
| MXC | methoxychlor |
| PBDE | polybromové difenyletery |
| PCB | polychlorované bifenyly |
| PGC | primordiální zárodečné buňky |
| PKA | protein kináza A |
| POPs | perzistentní organické polutanty |
| ROS | reaktivní formy kyslíku |
| StAR | akutní regulační protein |
| U.S. EPA | Agentura pro ochranu životního prostředí |
| WHO | Světová zdravotnická organizace |

1 Úvod

V průběhu historie lidé vytvořili vydatné množství chemikálií, které se přidávají do různých produktů pro vylepšení jejich vlastností. Zpočátku se tyto látky zdály jednoznačně prospěšné s řadou pozitivních účinků. Díky bohatému využívání a rostoucí produkci chemikálií došlo nevyhnutelně k jejich uvolnění do přírodního prostředí, kde řada látek prokázala schopnost pronikat do organismu a následně ovlivňovat hormonální působení. Exogenní chemikálie disponující schopností ovlivňovat působení hormonů lidí i živočichů se nazývají endokrinní disruptory (EDs). Endokrinní systém syntetizuje a uvolňuje hormony, které regulují vývoj orgánů a jejich funkce. Většina EDs zasahuje do hormonálních regulací narušením signálních cest, hormonální syntézy či napodobováním hormonů s následnou vazbou na receptor (Wuttke et al., 2010). Opomenout nejdou ani epigenetické změny způsobené EDs (Zama and Uzumcu, 2010). Dle Endokrinologické společnosti vykazuje přibližně tisíc chemikálií endokrinně disruptivní efekty. V kategorii endokrinních disruptorů se vyskytují látky jako pesticidy, fungicidy, změkčovadla, zpomalovače hoření, průmyslové chemikálie, přirozeně se vyskytující fytoestrogeny a spousta dalších. K průniku do lidského organismu dochází více cestami, nejčastěji jejich požitím, inhalací nebo přes kůži. Protože většina EDs je lipofilních, může docházet k jejich akumulaci v tukové tkáni, dlouhodobému přetrvávání v těle a jejich obtížnému vylučování. Narušení hormonální činnosti může vést k vývojovým problémům, zhoršené plodnosti a mnoha dalším abnormalitám. Dle aktuálních údajů se přibližně jedna z devíti žen v reprodukčním věku potýká s fertilitními potížemi. Nejčastějšími důvody těchto problémů bývají různá onemocnění (např. endometrióza, syndrom polycystických ovarií, diabetes nebo sexuálně přenosné nemoci). Řada studií poukazuje na možnou souvislost mezi EDs a některými onemocněními reprodukčního traktu žen, zejména endometriózou a syndromem polycystických ovarií. Cílem této bakalářské práce je shrnout poznatky o endokrinních disruptorech, o způsobech jejich regulace v přírodním prostředí a o jejich účincích na samičí reprodukční systém savců s důrazem na ovlivnění vývojové kompetence savčího oocyty.

2 Rozdělení endokrinních disruptorů

Skupina známých endokrinních disruptorů je velmi heterogenní. EDs lze rozdělit do skupin z více hledisek, podle jejich výskytu či způsobu působení. Nejčastěji uváděné rozdělení je do dvou skupin dle jejich původu. Do první skupiny patří přirozeně se vyskytující EDs, kam řadíme například fytoestrogeny (genistein). Do druhé, rozsáhlejší skupiny řadíme EDs, které jsou syntetizovány neboli uměle vytvořené. Tyto můžeme dělit dále do následujících skupin (Diamanti-Kandarakis et al., 2009):

- a) Syntetické látky používané jako průmyslová maziva či rozpouštědla a jejich vedlejší produkty (např. polychlorované bifenyly, polybromové difenylethery).
- b) Plasty (např. bisfenoly: bisfenol A, bisfenol S).
- c) Změkčovadla (např. ftaláty).
- d) Pesticidy (např. atrazin, cypermethrin, methoxychlor, endosulfan)
- e) Fungicidy (např. vinklozolin)
- f) Léky (např. diethylstilbestrol, ethinylestradiol (17 α -ethinyl estradiol)).

U níže uvedených (skupin) chemikálií jsou endokrinně disruptivní účinky popsány u člověka či jiného organismu zatím nejpodrobněji.

2.1 Polybromové difenylethery (PBDE)

Znečištění prostředí polybromovými difenylethery (PBDE) je celosvětový problém. Jedná se o látky obsažené ve směsích, které zpomalují proces hoření. Zpomalovače se přidávají do plastů, textilních potahů či do nátěrů pro ochranu dřevěných nebo ocelových konstrukcí. Další široké užití zpomalovačů je v oblasti elektroniky, např. pro elektronické konektory nebo pro izolaci vodičů a kabelů. Použitím zpomalovačů se dosahuje vyšší úrovně požární bezpečnosti (Rahman et al., 2001). Podle několika studií souvisí přítomnost PBDE s horší kvalitou spermií u lidí (Yu et al., 2018). Výsledky studií provedených na samčích hlodavcích dokládají, že výskyt PBDE v organismu je spojen se sníženou spermatogenezí a poruchami reprodukčního traktu (Kuriyama et al., 2005, Zhang et al., 2020). Vzhledem k hojnému výskytu a toxicitě PBDE, zejména pro volně žijící živočichy, jsou od roku 2009 některé sloučeniny omezeny Stockholmskou úmluvou (Overview in the Stockholm convention). V důsledku omezení PBDE se jako náhrada začaly používat jiné zpomalovače hoření, konkrétně alternativní halogenové zpomalovače hoření (AHFR). Řada studií již poukazuje na naměřené hladiny v přírodním prostředí blížící se hodnotám PBDE a vzhledem k podobnému chemickému složení lze předpokládat obdobné účinky na organismy. Rostoucí hodnoty AHFR

v přírodním prostředí již byly doloženy v různých částech světa, např. ve Švédsku, USA a Velké Británii. Lidé se nejčastěji dostanou do kontaktu s těmito látkami dermální cestou nebo požitím prachu (Yang et al., 2022).

2.2 Polychlorované bifenyly (PCB)

Polychlorované bifenyly (PCB) byly rozsáhle používány v různých průmyslových odvětvích jako přísada zpomalující hoření. K hojnému používání docházelo zejména od třicátých do sedmdesátých let dvacátého století, pak byla jejich produkce omezována (Safe, 1984). Díky rozsáhlému uvolnění PCB do prostředí došlo k proniknutí do potravního řetězce a PCB byly detekovány i v lidském mléce (Listing of POPs in the Stockholm convention). Zvířata a lidé jsou účinkům PCB vystaveni mnoha různými cestami, např. dýcháním, příjmem potravy, pitím nebo požitím prachu (Anh et al., 2021). Jsou klasifikovány jako látky toxické, které mohou způsobit různé zdravotní potíže, včetně komplikací v reprodukčním traktu. Roku 2011 byly PCB zařazeny na seznam perzistentních organických polutantů Stockholmské konvence a o dva roky později Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) do první skupiny karcinogenních látek pro lidi (Listing of POPs in the Stockholm Convention).

2.3 Diethylstilbestrol, DES

Diethylstilbestrol, DES (syntetický nesteroidní estrogen) se uvádí jako příklad ED, jehož působení mělo nepříznivý dopad na živočichy (včetně lidí) v raných vývojových stádiích. Než byl zakázán počátkem 70. let, byl podáván těhotným ženám s cílem zabránit spontánním potratům a podpořit růst plodu. I když k podávání DES těhotným ženám již přes čtyřicet let nedochází, stále můžeme pozorovat nežádoucí účinky (U.S. EPA, 2015). Gravidní ženy, které DES užívaly, mají mírně vyšší riziko rakoviny prsu. U žen vystavených DES v prenatálním období se mohou objevovat strukturální anomálie reprodukčního traktu, neplodnost, problémy s početím nebo rakovina pochvy. Muži, kteří byli vystaveni DES in utero, čelí vyššímu výskytu abnormalit genitálií a zvýšenému riziku rakoviny prostaty a varlat (Schrager and Potter, 2004).

In vitro bylo na myších oocytech pozorováno, že DES narušuje maturaci oocytu, tvorbu dělicího vřeténka a extruzi prvního polárního tělíška (Ding et al., 2020).

2.4 17 α -ethinylestradiol (EE2)

17 α -ethinylestradiol (EE2) je syntetický estrogen odvozen od estradiolu a hojně používaný jako kombinované perorální kontraceptivum. EE2 je speciálně navržen tak, aby bránil přirozenému reprodukčnímu cyklu prostřednictvím estrogenového receptoru. Během čištění odpadních vod není EE2 zcela odstraněn, což vede ke kontaminaci povrchových vod a

jeho vstupu do potravního řetězce (Caldwell et al., 2008). Hladiny EE2 ve vodě negativně ovlivňují plodnost a reprodukci zejména ryb, například nižší produkcí a kvalitou gamet, feminizací samčích ryb nebo také změnami v chování (Parrott and Blunt, 2005). Ve studii prováděné na březích myších měly již nízké hladiny EE2 vliv na vývoj plodu. Nízké dávky (odpovídající kontaminaci vody a potravy) vedly k abnormálně vyššímu růstu plodu a placenty. Vyšší dávky EE2 podávané v období březosti vedly k úmrtí plodu (Meyer et al., 2019).

2.5 Bisfenol A (BPA)

V plastech se vyskytuje bisfenol A (BPA), který patří k nejvíce studovaným EDs. Nalezneme jej v například v lahvích, hračkách, obalech pro různé účely včetně jídla a pití nebo v termopapíru. Termopapír je potažený látkami, které během tepelného tisku prochází barevnou změnou v oblastech, kde dochází k zahřívání, a vytváří výsledný obraz. Tato metoda se široce využívá zejména pro tisk účtenek nebo štítků. BPA byl poprvé syntetizován koncem devatenáctého století. Později se bisfenol A stal jedním z nejvyužívanějších látek celosvětově, díky schopnosti polymerovat a tvořit tak lehký, průhledný a levný plast odolný proti nárazům (Eladak et al., 2015). Do lidského organismu nejčastěji proniká požitím kontaminovaných potravin nebo přes kůži prostřednictvím termopapíru (Zalko et al., 2011). Laboratorně byl vliv BPA na organismus studován zejména na samčích hlodavcích. Již mnoho prací upozorňuje na reprodukční problémy samců v souvislosti s BPA. I nižší prenatální dávky BPA způsobují řadu reprodukčních problémů, včetně snížené motility a počtu spermií. U samců, jejichž matky byly vystaveny BPA a následně je krmily mateřským mlékem, byla pozorována snížená steroidogeneze Leydigových buněk a tím i snížené hladiny testikulárního testosteronu (Richter et al., 2007). Samice vystavené BPA se projevují nepravidelným estrálním cyklem v důsledku snížené hladiny LH v krvi (Rubin et al., 2001). Aktuálně je usilováno o bezpečnou náhradu této běžně používané sloučeniny. Jako alternativy byly vytvořeny sloučeniny bisfenol S (BPS) a bisfenol F (BPF). Nové studie již dokládají v prostředí koncentrace těchto analogů, které se blíží hladinám BPA, a naznačují také jejich podobnou toxicitu vůči lidským buňkám jako u BPA (Harnett et al., 2021). Obecně jsou však analogy dosud používány méně a BPA tak zůstává nejběžněji se vyskytujícím bisfenolem (Xing et al., 2022).

2.6 Ftaláty

Ftaláty jsou estery kyseliny ftalové, obsahující benzenové jádro se dvěma esterovými skupinami. S rostoucí délkou uhlíkatého řetězce nebo molekulární hmotností klesá jejich rozpustnost ve vodě. Jsou to kapaliny olejovité povahy, rozpouštějící se ve většině organických

rozpouštědlech s vysokou teplotou varu. Užívají se jako změkčovadla, přidávají se do polyvinylchloridových výrobků pro zlepšení flexibility a prodloužení životnosti (Przybylińska and Wyszowski, 2016). Do lidského organismu se ftaláty dostávají inhalací, požitím nebo i přes kůži během celého života včetně prenatálního období (Blount et al., 2000). U myších samic vedly vyšší dávky di-2-ethylhexyl ftalátu (DEHP) ke zmenšení granulózniých buněk a snížené produkci estradiolu. Nedochozelo rovněž k uvolnění potřebného množství LH pro ovulaci, což mělo za následek prodloužení estrálního cyklu a přeměnu folikulů na cysty (Davis et al., 1994). Samčím hlodavcům se snížila po expozici DEHP hmotnost varlat, produkce spermií a u některých jedinců docházelo dokonce k atrofii semenných váčků a infertilitě (Kavlock et al., 2006). U žen ftaláty ovlivňovaly průběh těhotenství, byly spojené se ztrátou plodu, předčasným porodem či nižší porodní hmotností (Wang and Qian, 2021). Rovněž metabolity ftalátů vykazují toxicitu a ovlivňují řadu fyziologických funkcí savců. Na molekulární a buněčné úrovni mohou metabolity působit toxicky na strukturu DNA, genovou expresi, výjimkou není ani poškození enzymů či proteinů nebo změna buněčné signalizace (Zhang et al., 2021).

2.7 Atrazin

Herbicid atrazin patří k nejvíce používaným, hojně studovaným a kontroverzním pesticidům, zejména kvůli jeho účinkům na volně žijící zvířata (Rohr, 2021). Herbicid se používá k regulaci růstu zejména jednoletých trav, například kukuřice nebo cukrové třtiny. Nejpravděpodobněji se lidé herbicidu vystavují požitím pitné vody nebo kravského mléka (Urseler et al., 2022). Jako lipofilní herbicid se může atrazin bioakumulovat v tkáních bohatých na tuky (tuková tkáň, mozek, játra nebo ledviny) a za určitých podmínek (laktace) může být mobilizován z tukové tkáně a secernován do mateřského mléka (Čajka and Hajšlová, 2003). Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) atrazin kategorizovala jako karcinogenní sloučeninu (IARC, 1999). Účinky na reprodukční systém jsou potvrzeny pracemi na zvířatech, které ukazují, že atrazin narušuje endokrinní systém pro více tříd živočichů. U zvířat byl prokázán vliv atrazinu na změny hormonálních hladin v krvi, což narušilo jejich schopnost reprodukce. Poškození bylo pozorováno také na ledvinách, játrech a srdci (ATSDR, 2003). Na základě soustavné kontaminace podzemních vod a potenciálních rizik pro lidské zdraví byl v roce 2003 atrazin zakázán v Evropské unii, nicméně v mnoha zemích je stále využíván (Bethsass and Colangelo, 2006).

2.8 Methoxychlor (MXC)

Methoxychlor (MXC) je organochlorový insekticid, poprvé syntetizovaný v roce 1893, ale komerčně vyráběný v USA od roku 1946 (Cummings, 1997). Primárně se užívá jako insekticid proti mouchám, komárům, švábům či jinému hmyzu (Bhardwaj and Saraf, 2020), ale používal se také ve veterinární medicíně proti ektoparazitům (U.S. EPA, 2000). Jeho výskyt byl prokázán v půdě, sedimentech, vodě, biotě (Stockholm convention), fyto- i zooplanktonu (Kang et al., 2022) stejně jako v lidské krvi, mateřském mléce, placentě a tukové tkáni (Knapczyk-Stwora et al., 2022). MXC slouží jako náhrada za dichlorodifenyltrichlorethan (DDT), který byl celosvětově používán do 70. let, kdy byl vzhledem k toxickým účinkům postupně zakazován. Už v padesátých letech byla u kohoutů prokázána inhibice sekundárních pohlavních znaků a růstu varlat vlivem DDT (Burlington and Lindeman, 1950). Řada studií ukázala, že MXC a jeho metabolity inhibují folikulogenezi, růst antrálního folikulu v buněčné kultuře a také zvyšují výskyt folikulární atrezie (Knapczyk-Stwora et al., 2022). MXC má vliv na neplodnost savců, u samic insekticid způsobuje prodloužení estrálního cyklu, neplodnost, sníženou ovariální hmotnost, popřípadě ovariální cysty (Aoyama et al., 2012). Dnes již methoxychlor společně s DDT spadá mezi perzistentní organické polutanty (POPs) Stockholmské konvence.

2.9 Vinklozolin

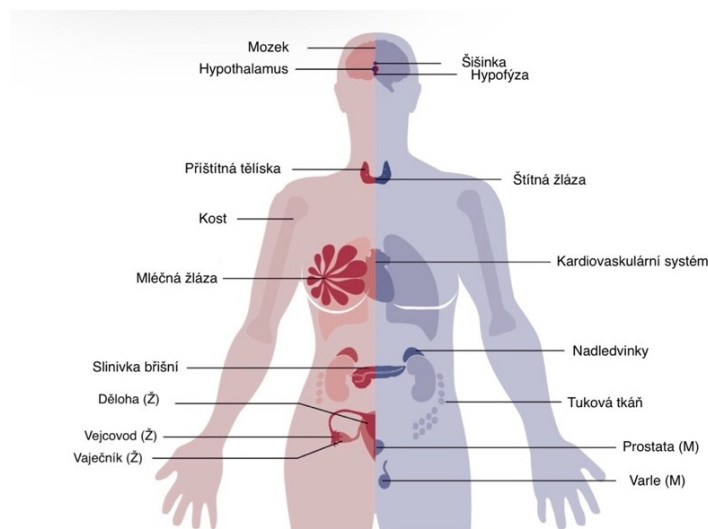
Vinklozolin patří mezi nejvíce používané fungicidy v boji proti plísním vyskytujícím se v ovoci, zelenině a okrasných rostlinách. Vzhledem k pravidelné prevenci šedé plísně rodu *Botrytis* na ovocných stromech a rostlinách se snadno dostává do lidského organismu. Byla prokázána cirkulace vinklozolinu ve vodě i vzduchu a je tak možný i jeho výskyt na neošetřených potravinách (Baumeister et al., 2002). Vinklozolin a jeho metabolity narušují reprodukční systém více způsoby, významná je především jejich antiandrogenní aktivita (Kelce et al., 1994). Prenatální působení vinklozolinu vedlo u potkanů k redukci počtu Leydigových buněk a snížené syntéze testosteronu (Wu et al., 2020). I při nízkých hladinách vinklozolinu byla u myších samců pozorována snížená hmotnost prostaty či jiných pohlavních orgánů. U vyšších dávek byl pozorován větší rozdíl v hmotnosti pohlavních orgánů, popřípadě další změny urogenitálního systému (U.S. EPA, 2000).

2.10 Fytoestrogeny

Fytoestrogeny jsou sloučeniny podobné savčímu estrogenu, estradiolu, schopné se vázat na estrogení receptory, účinněji na receptory typu β (Morito et al. 2001). Primárně pocházejí z rostlin, nejvýrazněji jsou přítomné v různé zelenině, ovoci, obilovinách a zejména v sójových bobech či v náhradách za živočišné bílkoviny jako je tofu nebo tempeh, některé lze také laboratorně syntetizovat (Sirotkin and Harrath, 2014). Fytoestrogeny lze rozdělit na základě jejich chemické struktury do více skupin, např. chalkony, flavonoidy, isoflavonoidy, lignany, stilbenoidy a další (Dixon, 2004). První úvahy a nepřímé důkazy, že rostliny mohou obsahovat látky s estrogení aktivitou, přicházely v polovině minulého století (Bennetts et al., 1946, Pope and Wright, 1954). U ovcí z australských pastvin docházelo k tzv. jetelové nemoci spojené s poruchami funkce a růstu reprodukčních orgánů a se změnou chování v období páření. Tyto reprodukční problémy ovcí souvisely s pastvou červeného jetelu, který obsahoval významné množství isoflavonoidů (Rossiter and Beck, 1966). K nejvíce studovaným fytoestrogenům patří genistein, který v živočišných buňkách způsobuje řadu efektů, včetně inhibice tyrosin kinázy (Dixon and Ferreira, 2002). Díky své podobné struktuře s 17β -estradiolem se genistein může navázat na estrogení receptory a působit jako ED. U žen genistein vyvolává změny ve folikulogenezi a steroidogenezi. Nadměrná konzumace genisteinu může být příčinou neplodnosti v důsledku poškození estrogeních receptorů nebo negativního vlivu na endometriální receptivitu (Toktay et al., 2020). Genistein je však rovněž studován pro své potenciální zdraví prospěšné účinky v souvislosti s prevencí nádorových onemocnění. V některých buňkách inhibuje buněčnou proliferaci a blokuje buněčný cyklus ve fázi G2 (např. v buňkách mléčné žlázy), což může přispět k prevenci rakoviny prsu např. konzumací sóji (Cornwell et al., 2004). Zjištění, že neoplastické (nádorové) buňky vykazují vůči genisteinu nižší citlivost než buňky nonneoplastické (nenádorové) (Singletary et al., 2002), svědčí právě pro preventivní potenciál genisteinu v raných fázích nádorového procesu, ale nikoli v pozdějších rozvinutých fázích onemocnění. Na druhé straně, některé studie poukazují na možné pronádorové působení genisteinu, např. zvýšený počet karcinogenem navozených aberantních kryptových ložisek v tlustém střevě potkanů nebo chromozomální aberace v lidských periferních lymfocytech (Dixon and Ferreira, 2002).

3 Endokrinní systém

Endokrinní systém je soustava žláz a tkání produkujících a secernujících hormony, které v těle regulují širokou škálu fyziologických procesů a přispívají tak k homeostáze. Zajištění fyziologických hormonálních hladin závisí na interakci orgánů produkujících hormony a jejich cílových tkání. Množství syntézy hormonu a jeho uvolnění je dáno spoluprací mnoha molekulárních a fyziologických procesů, včetně regulace genové exprese, exocytózy vesikulů obsahující hormony, metabolismu, steroidogeneze lipofilních hormonů, transportu oběhovým systémem, exkrece, degradace a mnoha dalších (Kleine and Rossmanith, 2016). Endokrinní žlázy jsou rozmístěny po celém těle, produkují hormony, které jsou uvolňovány do oběhového systému a plní funkci signálních molekul. Endokrinní žlázy se od exokrinních odlišují nepřítomností vývodů a sekrecí hormonů přímo do krve. Mezi nejvýznamnější endokrinní žlázy řadíme například hypothalamus, hypofýzu, štítnou žlázu, nadledviny, Langerhansovy ostrůvky pankreatu, příštítná tělíska, u mužů varlata, u žen vaječníky a (během těhotenství) placentu (obr. 1). Pro optimální regulaci musí být hladiny hormonů ve fyziologicky relevantním rozmezí a jakékoliv déletrvající vychýlení vyústí téměř vždy v dysfunkci nebo nemoc.

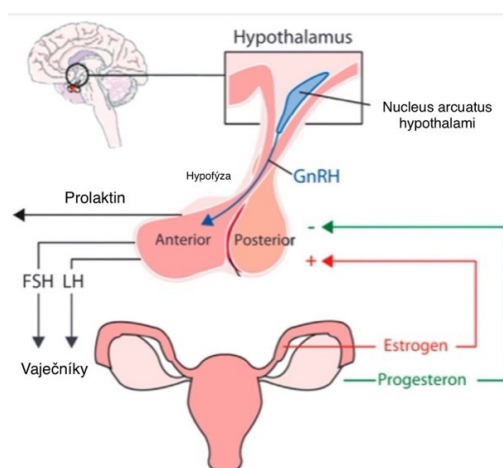


Obr. 1: Endokrinní žlázy v lidském těle, (Ž): ženy, (M): muži (převzato a upraveno z Gore et al., 2015).

4 Fyziologie ženského reprodukčního systému

Pro reprodukční zdraví žen jsou stěžejní následující hormony na třech úrovních řízení: hormon uvolňující gonadotropiny (GnRH) hypothalamu, gonadotropní hormony hypofýzy FSH (folikulostimulační hormon) a LH (luteinizační hormon), které v těhotenství doplňuje choriový gonadotropin (hCG), a steroidní hormony vaječníků estrogeny a progesteron.

Oscilující hladiny FSH společně s LH řídí menstruační, nebo u zvířat estrální cyklus. Po zpracování signálů v neurosekrečních buňkách hypothalamu se uvolní GnRH do kapilár v oblasti eminentia medialis. Místem působení (cílovou tkání) GnRH je hypofýza, kde se váže na svůj receptor – receptor pro hormon uvolňující gonadotropiny (GnRHR) a právě tato vazba vyústí k aktivaci syntézy a následnému uvolnění LH a FSH do oběhu. Odlišné frekvence uvolňování GnRH zajišťují stimulaci jiných signálních drah a různou úroveň sekrece FSH a LH. Se zvyšující se frekvencí uvolňovaného GnRH preferenčně dochází k sekreci LH, naopak s klesající frekvencí pulzů se více uvolňuje FSH (Thompson and Kaiser, 2014). Secernované gonadotropní hormony pokračují dále krevní cestou ke gonádám. Pro každý gonadotropní hormon existuje receptor na plazmatické membráně, odkud se signál přenáší dovnitř cílových buněk pomocí různých signálních kaskád. LH a hCG se vážou na receptor luteinizačního hormonu (LHCGR), který je u žen exprimován zejména na thékálních buňkách. Pro FSH se nachází receptor folikulostimulačního hormonu (FSHR) dominantně na granulózních buňkách oocytů. V granulózních a thékálních buňkách následně probíhá steroidogeneze ovariálních hormonů estrogenů a progesteronu. Na základě vytvářeného množství steroidních hormonů je zpětnou vazbou hypothalamus informován, v jaké fázi menstruačního cyklu se systém nachází a jaké hladiny gonadotropních hormonů je potřeba syntetizovat. Správná regulace menstruačního cyklu vyžaduje bezchybnou součinnost celé osy hypothalamus – hypofýza – ovária (Obr. 2). U mnoha žen mohou být modifikovány např. odpovědi na GnRH vedoucí k odlišné sekreci gonadotropinů a následně různým reprodukčním problémům jako amenorea nebo polycystické vaječníky (Thompson and Kaiser, 2014).



Obr. 2: Schéma osy hypothalamus – hypofýza – gonády u žen před ovulací (převzato a upraveno z Pennell, 2013), FSH: folikulostimulační hormon, LH: luteinizační hormon, GnRH: hormon uvolňující gonadotropiny.

5 Vývojová kompetence savčího oocytu

Vývojovou kompetencí oocytu se označuje schopnost oocytu vytvořit zralou samičí gametu, která je schopná oplození a vývoje embrya do stádia blastocysty. Výčet událostí, během kterých lze vývojovou kompetenci savčích oocytů narušit je velice obsáhlý, začínající již v prenatalním období. Pod termínem vývojová kompetence oocytu se skrývá řada komplexních procesů od vývoje oocytu, folikulogeneze, jaderného a cytoplazmatického zrání a ovulace po oplození a dokončení meiózy. Nejzásadnější pro zralý oocyt je bezpečný průběh meiotického dělení odehrávající se během výše jmenovaných událostí (Picton et al., 1998). Veškeré uvedené procesy podléhají komplexnímu řízení gonadotropními a ovariálními steroidními hormony.

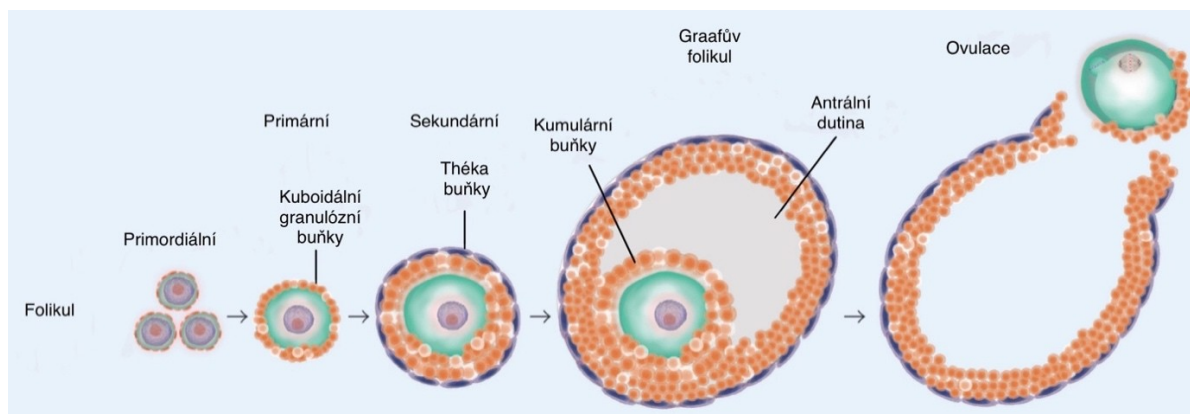
5.1 Vývoj oocytu

Vývoj oocytu lze rozdělit na tři fáze – fáze množení, růstu a zrání. Začátek vývoje samičích gamet se odehrává již v prenatalním období. Lidské primordiální zárodečné buňky (PGC) se začínají diferencovat do oogonií devět týdnů po oplození, během této diferenciace se téměř dvojnásobně zvyšuje počet oogoniálních mitochondrií v porovnání s těmi v PGC (Motta et al., 2000). Při postnatálním vývoji oocyty procházejí dvěma procesy – růstem a zráním, výsledkem kterých dochází k hromadění mRNA, proteinů a organel (Collado-Fernandez et al., 2012). Nové oogonie během postnatálního vývoje už nevznikají, část oogonií podléhá atrezii a jen část vstupuje do prvního meiotického dělení, během něhož vznikají primární oocyty. Primární oocyt žen podléhá růstu, meióza je pozastavena v profázi I až do období puberty či dospělosti (může být pozastavena i 40 let). Po nástupu puberty se pod vlivem hormonálního působení v rámci některého menstruačního cyklu dokončuje první meiotické dělení, čímž před ovulací vzniká sekundární oocyt s vyloučeným prvním polárním tělískem, který vstupuje do druhého meiotického dělení. Většina živočichů ze třídy savců (včetně lidí) pozastavuje dělení v metafázi II, ve které dochází k oplození a až tehdy je homeotypické dělení dokončeno a oddělené druhé polární tělísko.

5.2 Folikulogeneze

S vývojem oocytu a steroidogenezí úzce souvisí vývoj folikulů. Nejmenší a nejpočetnější stádium se nazývá primordiální folikul, při kterém na oocyt přiléhá pouze jedna vrstva plochých granulóznic buněk. V následujícím primárním folikulu je oocyt obklopený granulózními buňkami kubického tvaru. Granulózní buňky se rozrůstají do více vrstev v sekundárním folikulu. Současně se formuje antrální dutina a thékální buňky na povrchu folikulu produkují v nízkém množství androgeny (Fortune, 2003). Finální Graafův folikul s plně vyvinutou antrální dutinou po prudkém vzrůstu LH praská a uvolňuje oocyt (Obr. 3).

Uvolněný oocyt je zachycený vejcovodem, ve kterém (v části ampula) obvykle dochází k oplození. Prasklý folikul se dočasně transformuje do útvaru secernujícího hormonu, žlutého tělíska (corpus luteum). Žluté tělíska produkuje (v druhé polovině menstruačního cyklu) progesteron i estrogeny. Jeho obecnou funkcí je připravit tělo na zahájení a udržení těhotenství. Cirkulující progesteron v těle zpětnovazebně cílí do vyšších úrovní osy hypothalamus – hypofýza – gonády. Inhibuje sekreci GnRH z hypothalamu a snižuje množství jeho receptorů v hypofýze, což má za následek nižší uvolňování gonadotropinů (zejména LH) a zabraňuje tak další ovulaci (Niswender et al., 2000). Bez dalších stimulů přetrvává corpus luteum několik dní a vlivem nedostatku LH zaniká. Při těhotenství je žluté tělíska stimulováno hCG produkovaným placentou, přetrvává celé těhotenství a spolu s placentou umožňuje sekreci progesteronu až do konce těhotenství. Progesteron stimuluje růst a sekreční schopnosti dělohy, podporuje vyvíjející se embryo a ovlivňuje vývoj mléčných žláz (Reynolds and Redmer, 1999). Vlivem EDs dochází k narušení folikulogeneze ve více stádiích, výjimkou není ani snížený počet primárních nebo sekundárních folikulů (Xu et al., 2010). In vitro byla prokázána inhibice růstu myších antrálních folikulů (Peretz et al., 2011) stejně jako indukce jejich atrezie se zvýšenou expresí proatretického faktoru (Peretz et al., 2012). Dále u žen procházejících léčbou neplodnosti byly hladiny BPA v moči spojeny se sníženým počtem antrálních folikulů a získaných oocytů (Souter et al., 2013).



Obr. 3: Vývoj folikulů, (převzato a upraveno z Mihalas et al., 2017).

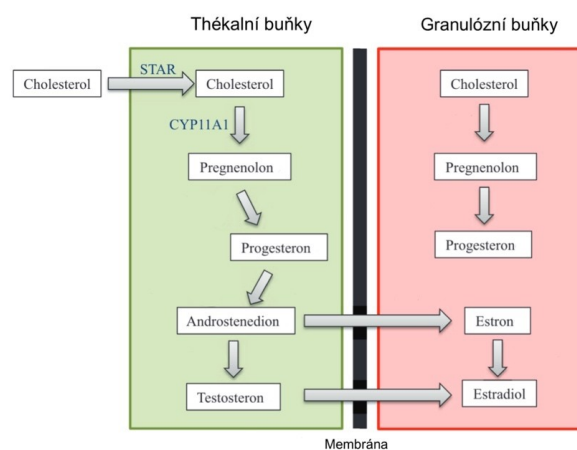
5.3 Zrání oocytu

K řádnému průběhu oplození a následnému úspěšnému vývoji embrya musí být oocyt kvalitní. U zralých a kompetentních oocytů musí správně proběhnout dva procesy, jaderné a cytoplazmatické zrání (Swain and Pool, 2008). Jaderné zrání začíná po arestu oocytu v profázi I meiotického dělení s cílem vytvořit haploidní buňku z diploidního stavu. Při procesu jaderného zrání dochází hned k několika událostem. Jaderná membrána se rozpouští a nukleus se uvolňuje

z germinálního vaku (GV), chromatin se kondenzuje do bivalentů, jenž se vyrovnávají do ekvatoriální roviny a následně dochází k separaci homologních chromozomů (Heikinheimo and Gibbons, 1998). Jaderné zrání je doprovázeno zráním cytoplazmatickým, při němž se v cytoplazmě oocyta akumuluji proteiny, ribonukleové kyseliny a další molekuly, potřebné pro udržení embryonálního vývoje do doby, než dojde k zahájení transkripce vlastního embryonálního genomu.

5.4 Steroidogeneze

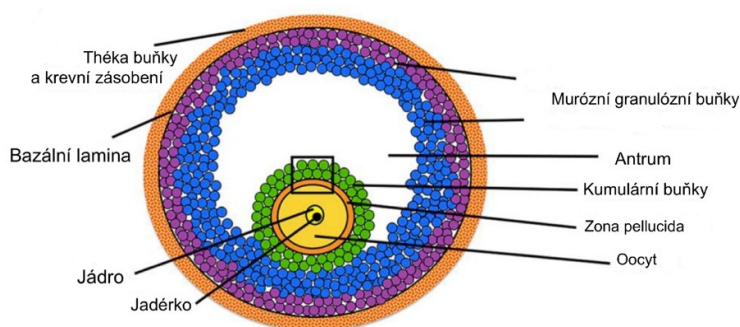
Steroidogeneze v ovariích je víceúhňový proces, klíčový pro ženský fenotyp a regulaci dějů ovariálního cyklu. Gonadotropní hormony působí na receptory spolu komunikujících granulózních či thékálních buněk a spouštějí signální dráhy vedoucí k syntéze a sekreci steroidů (Glistler et al., 2003). Výchozí látkou pro syntézu steroidů je cholesterol. LH se váže na receptor LHR lokalizovaný v thékálních buňkách, čímž stimuluje vychytávání cholesterolu prostřednictvím zvyšující hladiny cyklického adenosinového monofosfátu (cAMP), (Marsh, 1976) a následně aktivace proteinkinázy A (PKA) (Stocco and Clark, 1996). Vychytený cholesterol se transportuje na vnitřní membránu mitochondrií steroidogenním akutním regulačním proteinem (StAR) (Clark et al., 1994). V mitochondriích zajišťuje enzym cholesterol-desmoláza (z rodiny cytochromu P450, kódována genem CYP11A1) konverzi cholesterolu na pregnenolon (Hu et al., 2004), který následně difunduje do endoplazmatického retikula, kde může být konvertován na progesteron a následně na androstendion (Hanukoglu, 1992). Stále ještě v thékálních buňkách může proběhnout konverze na testosteron nebo pod vlivem LH difúze androstendionu do granulózních buněk, stejně jako následně testosteronu. V granulózních buňkách může FSH stimulovat přímou aromatizaci testosteronu na 17 β -estradiol, zatímco androstendion je aromatázou konvertován na meziprodukt estron (Obr. 4) (Fowler et al., 1978).



Obr. 4: Ovariální steroidogeneze (převzato a upraveno z Hannon and Flaws, 2015).

5.5 Zralý oocyt

Za komplexní interakce výše zmíněných a dalších mechanismů vzniká zralý oocyt, který je po oplození kompetentní vytvořit vyvíjející se embryo. Vývoj samičí gamety se odehrává ve folikulu, ve kterém se ukrývá až do doby ovulace. Během vývoje oocytu vznikají a vyvíjejí se rovněž jeho obaly (Obr. 5). Ve stádiu primárního oocytu je pozorovatelná první vrstva kuboidálních granulózniých buněk (Picton, 2001). Během folikulárního růstu se formuje zona pellucida, pokračuje proliferace granulózniých buněk a vyvíjí se vrstva thékálních buněk zajišťující mimo jiné krevní zásobení folikulu (Young and McNeilly, 2010). Formaci antrální dutiny provází diferenciaci granulózniých buněk na dvě buněčné populace. Na zonu pellucidu přiléhající kumulární buňky zajišťují podporu maturace a metabolismus oocytu. Druhá kolonie buněk, takzvané murální granulózni buňky zajišťují společně s thékálními buňkami syntézu steroidních hormonů. Kumulární buňky společně s oocytem tvoří komplex kumulus – oocyt (COC) (Collado-Fernandez et al., 2012).



Obr. 5: Schéma antrálního folikulu myši (převzato a upraveno z Baena a Terasaki, 2019).

6 Působení EDs na organismus

Schopnost EDs narušovat endokrinní systém je zpravidla univerzální, postihuje více skupin živočichů, včetně plazů, ptáků, ryb a savců. EDs působí na hormonální receptory, signální dráhy, metabolismus a modifikují tak nejrůznější hormonální funkce. EDs mohou systém ovlivnit napodobováním signálních molekul, antagonizací, změnou hladin hormonů, změnou rychlosti jejich syntézy či degradace, změnami exprese nebo působením na receptory. Hojně studované jsou aktuálně také epigenetické mechanismy na nejrůznějších organismech vystavených EDs. Přítomnost EDs v organismech je hojně spojována s reprodukčními problémy (Darbre, 2021), nádorovými onemocněními (Soto and Sonnenschein, 2010) i kardiovaskulárními, neurologickými či metabolickými poruchami (Ahn and Jeung, 2023). Převládající mechanismus působení EDs se mění s postupujícím věkem organismu v souvislosti

s proměnlivými fyziologickými hladinami hormonů (Chmelíková et al., 2018). Vzhledem ke komplikovanosti endokrinního systému s četnými zpětnovazebnými regulacemi je vliv EDs na organismus těžké předvídat.

6.1 Působení EDs na samičí reprodukční systém

V rámci třídy savců jsou účinky EDs studovány nejčastěji na hlodavcích, nicméně v in vitro podmínkách se využívá řada buněk, buněčných linií či tkání jiných živočichů. Látky s endokrinně disruptivním efektem u samic způsobují narušení menstruačního či estrálního cyklu, sníženou schopnost oplodnění i udržení plodu v těle (Lee et al., 2013). EDs ovlivňují reprodukční systém prostřednictvím celé osy hypothalamus – hypofýza – ovaria (Graceli et al., 2020), významné účinky byly popsány na úrovni vaječnicků (Patel et al., 2015) včetně ovlivnění folikulů, oocytů (Pocar et al., 2003) či steroidogeneze (Hannon et al., 2015). Opomenout nelze ani epigenetické efekty v důsledku expozice EDs (Rattan and Flaws, 2019). Pesticidy s endokrinně disruptivním efektem prokazatelně snižují hmotnost vaječnicků a zpožďují jejich vývoj (Gore et al., 2015). Byl prokázán vliv PCB a MXC na genovou expresi a sekreci GnRH, ovlivnění GnRH neuronů fytoestrogeny, fungicidy a pesticidy in vivo bylo doloženo změnami uvolňování GnRH/LH, genové exprese GnRH i počtu GnRH-uvolňujících neuronů (Gore, 2008). V rámci neuroendokrinní regulační sítě GnRH aplikace BPA a genisteinu potlačovala inhibiční a aktivovala stimulační členy sítě, čímž vedla k časnějšímu nástupu puberty (Mueller and Heger, 2014). Vyšší naměřené hladiny BPA v ženském těle se často dávají do souvislosti s onemocněním zvaným syndrom polycystických ovarií. Stále častěji se objevující onemocnění se projevuje zejména vyššími hladinami androgenů a nepravidelným menstruačním cyklem v důsledku konstantně zvýšené hladiny LH v krvi (Nestler, 1997).

6.2 Estrogenní receptory

Častým cílem EDs bývají jaderné receptory, zejména androgenní receptory a estrogenní receptory typu α ($ER\alpha$) a β ($ER\beta$). Estrogenní receptory jsou exprimovány v mnoha lidských buňkách a tkáních a uplatňují se jako ligand-dependentní jaderné transkripční faktory, které odpovídají na širokou škálu látek, nejčastěji hormonálního charakteru. Zajišťují řadu fyziologických funkcí v různých orgánových systémech, zejména v reprodukčním, kardiovaskulárním nebo skeletálním systému (Paterni et al., 2014). Ačkoli estrogenní receptory sdílejí podobné funkční mechanismy, bylo rozpoznáno několik rozdílů v transkripčních schopnostech (Couse and Korach, 1999). V kontextu ženské reprodukční soustavy se $ER\alpha$ nachází zejména v děloze, ve vaječnicích, přesněji v thékálních buňkách, nebo také v mléčné žláze. Typ β je přítomný hlavně v granulózích buňkách ovarií (Paterni et al., 2014). Interakcí

s estrogenními receptory mohou EDs ovlivňovat estrogenní signalizaci. EDs cílící na estrogenní receptory mohou signalizaci ovlivňovat přímo nebo nepřímo přes transkripční faktory, např. aryl uhlovodíkový receptor (AhR), nebo modifikací metabolických enzymů, které jsou stěžejní pro estrogenní syntézu a metabolismus (Shanle and Xu, 2011). Estrogenní receptory ER α a ER β jsou primárně určeny pro ženský pohlavní hormon, estrogen 17 β -estradiol. Většina EDs vykazuje v organismu estrogenní účinky, např. BPA, ftaláty nebo fytoestrogeny (Kiyama and Wada-Kiyama, 2015).

7 EDs: vývojová kompetence savčích oocytů

EDs ovlivňují vývojovou kompetenci oocytu mnoha způsoby. Ovlivňují hladiny gonadotropních hormonů (LH, FSH), což má téměř vždy za následek neuskutečnění ovulace. Výrazný počet studií se věnuje účinkům endokrinního disruptoru BPA na oocyty. BPA a ftaláty prokazatelně snižují růst folikulů a indukují folikulární atrezii myších antrálních folikulů v důsledku zvýšené exprese proatretického faktoru (Peretz et al., 2012). Další studie na myších poukázala mimo jiné na urychlení nábory primordiálních folikulů (Patel et al., 2015), procesu, při kterém vzniká primární folikul s vrstvou granulózních buněk kubického tvaru. Mnoho studií popisuje schopnost BPA snižovat kvalitu oocytů. Konkrétně BPA způsobuje defekty při meiotickém dělení a steroidogenezi (Hunt et al., 2003) nebo vyvolává epigenetické změny vedoucí k různým chybám v průběhu dělení či jiným defektům v samičí reprodukční soustavě (Rattan and Flaws, 2019). Cílem účinku řady EDs mohou být mitochondrie oocytů. Tyto orgány pod vlivem EDs generují nižší množství ATP a uvolňují významné množství reaktivních forem kyslíku (ROS) (Malott and Luderer, 2021). Podobné změny v oocytech lze pozorovat u starších nebo obézních žen.

7.1 EDs: steroidogeneze

Dříve se předpokládalo, že hlavním mechanismem působení EDs na hormonální regulace je jejich schopnost napodobovat endogenní hormony a vázat se na příslušné receptory (Sonnenschein and Soto, 1998). Další studie poukázaly také na změnu syntézy a sekrece či eliminaci přirozených hormonů pod vlivem EDs (Gregoraszcuk et al., 2008). V důsledku působení EDs dochází ke změnám exprese a katalytické aktivity steroidogenních enzymů s významnými dopady na syntézu steroidních hormonů. Účinky EDs na proces steroidogeneze se obvykle studují in vitro na izolovaných granulózních nebo thékálních buňkách. Přítomnost pesticidu DDT s popsáním endokrinně disruptivním působením na ženský reprodukční systém byla prokázána i ve folikulární tekutině (Al-Saleh et al., 2009). Vzhledem k přímému kontaktu

folikulární tekutiny s endokrinně aktivními buňkami či oocytem je tato skutečnost velmi znepokojující. U samic potkana vystavených DDT byly nalezeny snížené hladiny estradiolu v séru a při vyšších dávkách docházelo i ke zvýšení hladiny progesteronu (Hojo et al., 2006). V myších antrálních folikulech vystavených BPA byly významně snížené hladiny estradiolu, estronu, testosteronu a androstenedionu (Peretz et al., 2011).

7.2 EDs: meiotické defekty

Ve velkém počtu prací bylo popsáno nepříznivé působení EDs na průběh meiózy, čímž dochází k narušení vývojové kompetence oocyty. Mezi nejčastěji se objevující defekty lze zařadit zejména narušení formace dělicího vřeténka, případně neschopnost chromozomů seřadit se do ekvatoriální roviny nebo se navázat na dělicí vřeténko. Chyby dále nastávají při oddělení polárního tělíska (Ding et al., 2020), dochází ke komplikacím po znovuzahájení meiotického dělení, případně některé EDs způsobují meiotický blok. Některé studie naznačují, že EDs (BPA) mohou navozovat aneuploidii, (Hunt et al., 2003) nicméně jiné práce tento nálezk zpochybňují (Eichenlaub-Ritter et al., 2008). U prasečích oocytů kultivovaných *in vitro* v přítomnosti BPA byl prokázán pokles schopnosti dosáhnout metafáze II po 44 hodinách kultivace (Mlynarčíková et al., 2009). U myších oocytů kultivovaných s DES byly pozorovány neschopnost chromozomů srovnat se do ekvatoriální roviny, modifikace dělicího vřeténka, narušená cytoskeletální dynamika, zvýšená acetylace α -tubulinu a změna distribuce ER α s jeho akumulací v oblasti vřeténka (Ding et al., 2020).

7.3 EDs: mitochondrie v oocytech

S dozráváním oocyty ve vaječniku narůstá jeho objem a mitochondrie v něm proliferují na přibližný počet sto tisíc ve zdravém myším oocyty a až čtyři sta tisíc v oocyty lidském (Collado-Fernandez et al., 2012). Mitochondrie lze charakterizovat jako vysoce specializované organely zodpovědné především za produkci buňkou využitelné formy energie, ATP. Významnější odchylka od obvyklého počtu mitochondrií nebo porucha jejich funkce může významně ovlivnit maturaci oocyty a vést až k neplodnosti ženy (Chiaratti et al., 2018). V kontextu endokrinních disruptorů je prokázán růst hladin reaktivních forem kyslíku a snížení efektivity syntézy ATP. V myších oocytech kultivovaných s BPA byly pozorovány poruchy maturace a vypuzení prvního polárního tělíska, se kterými souvisela řada změn na úrovni organel (Pan et al., 2021). Mitochondriální dysfunkce se projevila abnormální distribucí mitochondrií, které namísto shlukování v oblasti vřeténka byly rozptýleny v celém oocyty, což může vést k nedostatečné dodávce ATP pro meiotické procesy. Mitochondriální membránový potenciál byl snížený. Abnormální byla i distribuce endoplazmatického retikula, která byla

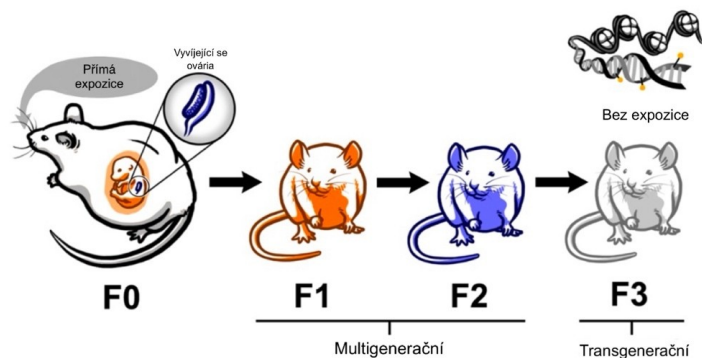
navíc doprovázena vyšší úrovní stresu endoplazmatického retikula. Distribuce Golgiho aparátu ovlivněna nebyla, nicméně byly pozorovány jeho strukturální změny zapříčinitelné sníženou expresí proteinu GM130, který je lokalizovaný na cis-straně aparátu a podílí se na udržování jeho struktury (Nakamura et al., 1995). Dohromady tyto organelové abnormality vedou k regionální dysfunkci oocyty a poruše oocytární maturace.

7.4 Epigenetický vliv EDs

Schopnost EDs vyvolávat infertilitu či různé nemoci je jistě znepokojující, nicméně šíře a dosah problémů mohou být podstatně větší vzhledem k epigenetickým mechanismům (Skinner, 2008). Epigenetika označuje studium změn funkce genu, které jsou mitoticky nebo meioticky dědičné, ale nejsou spojeny se změnou sekvence DNA (Wu and Morris, 2001). Hlavní epigenetické mechanismy zahrnují metylace DNA, post-translační modifikace histonů nebo nekódující RNA (Zama and Uzumcu, 2010). Řada epigenetických změn v důsledku působení EDs byla demonstrována u orgánů reprodukční soustavy a její řídicí osy, zejména hypothalamu, dělohy a vaječníků (Rattan and Flaws, 2019). Epigenetickými procesy mohou EDs narušit např. v ovariích dlouhý seznam procesů včetně formace primordiálního folikulu, růstu a zrání folikulu nebo steroidogeneze (Hannon et al., 2015). EDs tak mohou prostřednictvím epigenetických mechanismů působit multigeneračním nebo transgeneračním způsobem.

7.4.1 Multigenerační a transgenerační epigenetická dědičnost

Jako multigenerační efekt označujeme efekt či fenotyp, který se objevil v několika generacích vystavených přímému působení EDs během vývoje. K pozorování transgeneračního efektu musí být efekt nebo fenotyp vyjádřený u generace, která během vývoje nebyla přímo vystavená působení EDs. Dle obr. 6 byla F0 generace vystavena EDs přímo během dospělého života. V rámci této expozice byla působení EDs vystavena prenatálně i generace F1 (jako embryo) a zárodečné buňky generace F2. Účinky pozorované v generaci F1 a F2 jsou multigenerační, u následující generace F3 by se jednalo o transgenerační efekt pravděpodobně v důsledku epigenetických změn (Skinner, 2008).



Obr. 6: Multigenerační a transgenerační účinky (převzato a upraveno z Rattan and Flaws, 2019).

7.4.2 Epigenetické efekty způsobené EDs v reprodukčním systému

Řada publikovaných studií nasvědčuje multigeneračním a transgeneračním projevům expozice EDs. Byl popsán případ patnáctileté dívky s malobuněčným karcinomem vaječnicků, jejíž babička brala DES v době, kdy byla těhotná s matkou pacientky (Blatt et al., 2003). Protože je malobuněčný karcinom ovarii v dospívání vzácný a etiologie neznámá, doporučují autoři v podobných případech transgenerační expozici DES v rámci klinické úvahy zvažovat. Ačkoli autoři této studie označují případ za příklad transgenerační expozice, jedná se spíše o multigenerační projev (pacientka představuje generaci F2). Podobně je s expozicí DES u předků spojován vaginální adenokarcinom u mladých žen v F1 generaci (Herbst et al., 1971). Vystavení disruptoru MXC během fetálního nebo neonatálního období vedlo k ovlivnění funkce vaječnicků prostřednictvím metylačních změn (Zama and Uzumcu, 2009). Expozice MXC v období fetálního vývoje gonád zvyšovala u dospělých potkanů v generaci F3 výskyt různých onemocnění (onemocnění ledvin a vaječnicků, obezita) a analýza epigenomu spermií potkanů generace F3 ukázala tzv. diferencielně metylované oblasti (Manikkam et al., 2014). Po embryonálním vystavení PBA došlo transgeneračně u myši generace F3 v mozkové tkáni ke zvýšené mRNA expresi imprintovaného genu *Meg3* (Drobná et al., 2018), který je důležitý v souvislosti s centrální kontrolou předčasné puberty (Tao et al., 2015). Zvýšené hladiny BPA jsou rovněž spojovány s předčasnou pubertou u dívek (Supornsilchai et al., 2016).

8 Regulace EDs v životním prostředí

S rostoucími koncentracemi různých EDs v prostředí i organismech zesilují snahy o jejich regulaci a udržení nezávadného životního prostředí. Detekci a regulaci chemických sloučenin s potenciálně negativním působením na organismus či prostředí se zabývají zejména následující organizace a úřady. První, Agentura pro ochranu životního prostředí (U.S. EPA)

vznikla roku 1970 s výraznou podporou tehdejšího amerického prezidenta Richarda Nixona. Hlavním cílem agentury je ochrana lidského zdraví a životního prostředí. U.S. EPA vlastní řadu výzkumných center a specializovaných laboratoří, které se zaměřují na nejrůznější problémy a ohrožení životního prostředí a následně informace sdílejí s dalšími institucemi, snaží se vzdělávat celou společnost o udržitelnosti životního prostředí a také poskytuje granty mnoha institucím (neziskovým, vzdělávacím a dalším), zejména s enviromentální tematikou (U.S. EPA). Druhá, právně závazná mezinárodní dohoda – Stockholmská úmluva, se zabývá řešením chemického znečišťování prostředí, zejména eliminací chemických látek nazývaných perzistentní organické polutanty. Společným cílem obou těchto organizací je ochrana životního prostředí a lidského zdraví. Zaměřují se většinou na stejné chemické látky, např. všechny pesticidy zveřejněné ve Stockholmské úmluvě jsou regulovány také Agenturou pro ochranu životního prostředí. Spojené státy sice formálně podepsaly Stockholmskou úmluvu, nicméně ještě nedošlo k její ratifikaci (Stockholm Convention). Přibývající znečištění přírodního prostředí moří a oceánů vedlo ke vzniku další úmluvy zaměřené na ochranu mořského prostředí severovýchodního Atlantiku, úmluvy OSPAR. I tato úmluva se věnuje monitorování a snahám o snížení hladin některých látek s endokrinně disruptivním efektem (OSPAR).

8.1 U.S. EPA

Organizace U.S. EPA byla založena 2. prosince 1970 americkým prezidentem Richardem Nixonem. V šedesátých letech dvacátého století se začínaly šířit obavy ze znečištění ovzduší a vody podporované řadou rozsáhlých havárií. V Kalifornii havárie ropné plošiny zamořila pláže miliony litry ropy, v Clevelandu (Ohio) vzplanula spontánně r. 1969 řeka plná chemikálií. V důsledku narůstajících obav veřejnosti ze zhoršující se kvality vzduchu ve městech, znečištěné volné přírody a kontaminovaných vodních zdrojů prezident R. Nixon předložil senátu průlomou zprávu o životním prostředí s řadou požadavků na řešení klíčových problémů (zlepšení vodního hospodářství, standardy kvality ovzduší a snižování emisí motorových vozidel, federálně podporovaný výzkum snižování znečištění, legislativa odpadového hospodářství, relevantní daňové úpravy, bezpečnost mořského transportu ropy a další). Na základě doporučení nově vzniklé rady pak prezident Nixon předložil plán konsolidace všech federálních vládních programů na snižování znečištění životního prostředí do jediné centrální federální agentury, Agentury pro ochranu životního prostředí. Tato reorganizace významně zvýšila akceschopnost systému řešit rozsáhlou problematiku znečištění životního prostředí. Hlavním cílem agentury je, jak je již výše uvedeno, chránit životní prostředí a lidské zdraví. U.S. EPA se snaží o zajištění čistého vzduchu, vody a půdy zejména v USA.

Usiluje o snížení rizik pro životní prostředí na základě důkladného monitorování chemických látek na trhu z hlediska bezpečnosti a co nejrozsáhlejších vědeckých informací. (U.S. EPA)

8.2 Stockholmská úmluva

K přijetí Stockholmské úmluvy došlo ve Stockholmu v roce 2001, v platnost pak vstoupila r. 2004 a aktuálně na ni již přistoupilo 186 zemí světa. Zpočátku bylo identifikováno dvanáct chemikálií nepříznivě působících na lidi a ekosystém, které byly rozděleny do tří skupin: pesticidy, průmyslové chemikálie a vedlejší produkty. Toto rozdělení se stále uvádí, nicméně počet chemikálií na seznamu se významně zvýšil. Chemikálie, které je potřeba omezovat, jsou uvedeny na seznamu perzistentních organických polutantů (POPs). Některé sloučeniny na seznamu POPs spadají také do kategorie endokrinních disruptorů. Jako POPs jsou označovány organické látky, které se vyznačují specifickou kombinací fyzikálních a chemických vlastností. Po vstupu do prostředí zůstávají neměnné po velmi dlouhou dobu, v prostředí se dobře šíří přirozenými procesy zahrnujícími vzduch, vodu i půdu, akumulují se v živých organismech včetně lidí a na vyšších úrovních potravního řetězce se nacházejí ve vyšších koncentracích, jsou toxické pro lidi i volně žijící živočichy (Stockholm Convention, 2001). Konkrétní POPs Stockholmské úmluvy jsou rozděleny do tří listin (annexů), jedna sloučenina může být uvedena i na více listinách. U sloučenin na první listině (Annex A) musí státy přijmout opatření pro eliminaci produkce a používání těchto látek. V případě látek v Annexu B musí být přijata opatření k omezení jejich produkce a používání. U látek Annexu C mají přijatá opatření omezit úniky z antropogenních zdrojů a nadále pokračovat k jejich minimalizaci až úplné eliminaci (Stockholm convention, 2001).

8.3 OSPAR

Úmluva OSPAR pro ochranu mořského prostředí severovýchodního Atlantiku vstoupila v platnost dne 25. března 1998. Hlavním cílem úmluvy OSPAR je převážně ochrana a zachování zdrojů severovýchodního Atlantiku. Jedná se o právní nástroj umožňující řízení mezinárodní spolupráce v oblasti ochrany mořského prostředí severovýchodního Atlantiku. Činnosti řídí komise OSPAR, která je složena z představitelů vlád 15 signatářských zemí a Evropské unie. Název OSPAR je odvozen ze dvou původních úmluv dohodnutých v Oslu (r. 1972) a Paříži (r. 1974), které byly o dvacet let později (r. 1992) sjednoceny a aktualizovány se záměrem omezit vypouštění odpadu do moře. Mezi hlavní cíle úmluvy patří ochrana mořského prostředí před nepříznivými účinky lidské činnosti, předcházet či eliminovat znečištění, to vše za udržitelného využívání zdrojů. Úmluva obsahuje pět příloh (annexů), které se zabývají různými oblastmi, např. prevence a eliminace znečištění z pozemních zdrojů (Annex 1),

prevence a eliminace znečištění ze skladování či spalování odpadu (Annex 2), prevence a eliminace znečištění z příbřežních zdrojů (Annex 3). Annex 4 je zaměřen na hodnocení kvality mořského prostředí a jeho rozvoje a Annex 5 pojednává o ochraně a zachování ekosystémů a biologické rozmanitosti mořského prostředí. Monitorované látky se rozdělují převážně do dvou skupin. Chemikálie určené pro prioritní opatření podléhají podrobnému monitorování a zahrnují řadu látek s endokrinně disruptivním efektem, jako např. zpomalovače hoření, PCB, MXC nebo endosulfan. Druhá skupina obsahuje chemikálie vzbuzující obavy, které rozdělují do čtyř podskupin (A, B, C, D). I v této skupině se vyskytují látky s endokrinně disruptivními efekty: např. atrazin, DES nebo EE2 (OSPAR, 1992).

9 Závěr

Publikované studie přesvědčivě dokládají schopnost různých chemických látek ovlivňovat působení hormonů v organismu pro více tříd živočichů. EDs dokáží do organismu pronikat více způsoby během celého životního období: inhalací, pozřením nebo přes kůži. I bez přímé expozice EDs lze pozorovat nepříznivé účinky těchto látek, pravděpodobně díky epigenetickým efektům. Jejich značné rozšíření a mnohočetné mechanismy působení jsou velice znepokojující zejména pro budoucí generace, obzvláště vzhledem ke stále rostoucímu počtu potenciálně nebezpečných chemikálií a náročnosti jejich odstraňování ze životního prostředí. Expozice EDs může vést ke změnám v menstruačním (či estrálním) cyklu, modifikacím steroidogeneze nebo k různým poruchám vývoje oocyty. Ovlivňují množství uvolňovaných gonadotropních hormonů a narušením složitých zpětnovazebných řídicích mechanismů znemožňují ovulaci a narušují vývojovou kompetenci oocytů. Zasahují rovněž do průběhu folikulogeneze, v rámci, které urychlují nábor primordiálních folikulů nebo ještě obvykleji indukují atrezii antrálních folikulů. Dlouhá řada modifikací a poruch pod vlivem EDs byla pozorována v rámci meiotického dělení. Oocyty vykazují potíže při oddělení prvního polárního tělíska a ovlivněný je také celkový časový průběh dělení. Další defekty byly pozorované na úrovni dělicího vřeténka, které je zkrácené a s horší schopností navázat chromozomy. Narušena je rovněž schopnost chromozomů srovnat se do ekvatoriální roviny a rovnoměrně se rozdělit k pólům. Preferovaným cílem chemikálií s endokrinně disruptivními efekty jsou také organely oocyty. Asi nejdůkladněji popsány jsou účinky EDs na mitochondrie, které se projevují jejich odlišnou distribucí, sníženou syntézou ATP a vyšší produkcí ROS. Tyto popsány mitochondriální defekty zřejmě také přispívají k nižší kvalitě oocytů u starších nebo obézních žen. Z účinků na dalších organelách byla popsána pozměněná distribuce endoplazmatického retikula či strukturální anomálie na membráně Golgiho aparátu. Značná pozornost je v současné době věnována epigenetickým mechanismům, které mohou přispívat k dlouhodobému přetrvávání modifikací po více generací. Všechny výše popsány účinky EDs se negativně propisují do vývojové kompetence savčích oocytů.

Vzhledem k rozsáhlému (a stále narůstajícímu) počtu EDs a komplexní povaze jejich dosud popsáných účinků je zřejmé, že naše poznání nejrůznějších aspektů působení EDs je dosud omezené. Nedostatečná úroveň poznání pak nutně omezuje hledání účinných řešení směřujících ke snížení či odstranění EDs a potlačení jejich nežádoucích účinků, ať už na úrovni konkrétních organismů nebo životního prostředí jako celku. Závažnost situace je celosvětově snad již vnímána, jak dokládá řada mezinárodních úmluv a organizací, které se na problematiku

znečištění životního prostředí zaměřují (Stockholmská úmluva, U.S. EPA, OSPAR). Nicméně otázkou zůstává, zda je aktuální úsilí v globálním měřítku dostatečné na zvrácení trendu rostoucí průmyslové produkce a souvisejícího znečišťování. Velkou neznámou pak jsou dopady probíhající klimatické změny, které mohou postihovat řadu přirozených regeneračních mechanismů v regionálním i celoplanetovém rozsahu.

10 Seznam použité literatury

Ahn, C., and Jeung, E.B. (2023). Endocrine-Disrupting Chemicals and Disease Endpoints. *Int. J. Mol. Sci.* 24: 5342.

Al-Saleh, I., Coskun, S., El-Doush, I., Billedo, G., Mashhour, A., Jaroudi, K., et al. (2009). Outcome of in-vitro fertilization treatment and DDT levels in serum and follicular fluid. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 15: BR320-333.

Anh, H.Q., Watanabe, I., Minh, T.B., and Takahashi, S. (2021). Unintentionally produced polychlorinated biphenyls in pigments: An updated review on their formation, emission sources, contamination status, and toxic effects. *Sci. Total Environ.* 755: 142504.

Aoyama, H., Hojo, H., Takahashi, K.L., Shimizu-Endo, N., Araki, M., Takeuchi-Kashimoto, Y., et al. (2012). Two-generation reproduction toxicity study in rats with methoxychlor. *Congenit. Anom.* 52: 28–41.

ATSDR, Toxicological Profile for Atrazine. <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp153.pdf>

Baena, V., Terasaki, M. (2019). Three-dimensional organization of transzonal projections and other cytoplasmic extensions in the mouse ovarian follicle. *Sci Rep.* 9: 1262.

Baumeister, M., Steep, M., Dieckmann, S., Melzer, O., Klöppel, H., Jüriling, H., et al. (2002). Transfer of the fungicide vinclozolin from treated to untreated plants via volatilization. *Chemosphere* 48: 75–82.

Bennetts, H.W.; Underwood, E.J.; Shier, F.L. (1946). A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Australian Veterinary Journal* 22: 2–12.

Bethsass, J., and Colangelo, A. (2006). European Union Bans Atrazine, While the United States Negotiates Continued Use. *Int. J. Occup. Environ. Health* 12: 260–267.

Bhardwaj, J.K., and Saraf, P. (2020). *N*-acetyl-l-cysteine mediated regulation of DNA fragmentation, an apoptotic event, against methoxychlor toxicity in the granulosa cells of ovarian antral follicles. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 858–860: 503222.

Blatt, J., Van Le, L., Weiner, T., and Sailer, S. (2003). Ovarian Carcinoma in an Adolescent With Transgenerational Exposure to Diethylstilbestrol. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 25: 635.

Blount, B.C., Silva, M.J., Caudill, S.P., Needham, L.L., Pirkle, J.L., Sampson, E.J., Lucier, G.W., Jackson, R.J., Brock, J.W. (2000). Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environ. Health Perspect.* 108: 979-82.

Burlington, H., V F Lindeman, V.F. (1950). Effect of DDT on testes and secondary sex characters of white leghorn cockerels. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 74:48-51.

Caldwell, D.J., Mastrocco, F., Hutchinson, T.H., Länge, R., Heijerick, D., Janssen, C., et al. (2008). Derivation of an Aquatic Predicted No-Effect Concentration for the Synthetic Hormone, 17 α -Ethinyl Estradiol. *Environ. Sci. Technol.* 42: 7046–7054.

Clark, B.J., Wells, J., King, S.R., and Stocco, D.M. (1994). The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J. Biol. Chem.* 269: 28314–28322.

Collado-Fernandez, E., Picton, H., and Dumollard, R. (2012). Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *Int. J. Dev. Biol.* 56: 799–808.

Cornwell, T., Cohick, W., and Raskin, I. (2004). Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* 65 : 995–1016.

Couse, J.F., and Korach, K.S. (1999). Estrogen Receptor Null Mice: What Have We Learned and Where Will They Lead Us? *Endocr. Rev.* 20: 358–417.

Cummings, A.M. (1997). Methoxychlor as a Model for Environmental Estrogens. *Crit. Rev. Toxicol.* 27 : 367–379.

- Čajka, T., and Hajšlová, J. (2003). Polychlorinated Biphenyls and Organochlorine Pesticides in Human Milk from the Locality Prague, Czech Republic: A Comparative Study. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *70*: 913–919.
- Darbre, P.D. (2021). *Endocrine Disruption and Human Health*. Academic Press, London.
- Davis, B.J., Maronpot, R.R., and Heindel, J.J. (1994). Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Suppresses Estradiol and Ovulation in Cycling Rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *128*: 216–223.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., et al. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr. Rev.* *30*: 293–342.
- Ding, Z.M., Hua, L.P., Ahmad, M.J., Safdar, M., Chen, F., Wang, Y.S., et al. (2020). Diethylstilbestrol exposure disrupts mouse oocyte meiotic maturation in vitro through affecting spindle assembly and chromosome alignment. *Chemosphere* *249*: 126182.
- Dixon, R.A. (2004). Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol.* *55*: 225–261.
- Dixon, R.A., and Ferreira, D. (2002). Genistein. *Phytochemistry* *60*: 205–211.
- Drobná, Z., Henriksen, A.D., Wolstenholme, J.T., Montiel, C., Lambeth, P.S., Shang, S., Harris, E.P., Zhou, C., Flaws, J.A., Adli, M., Rissman, E.F. (2018). Transgenerational Effects of Bisphenol A on Gene Expression and DNA Methylation of Imprinted Genes in Brain. *Endocrinology* *159*: 132–144.
- Eichenlaub-Ritter, U., Vogt, E., Cukurcam, S., Sun, F., Pacchierotti, F., and Parry, J. (2008). Exposure of mouse oocytes to bisphenol A causes meiotic arrest but not aneuploidy. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* *651*: 82–92.
- Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerin, M.J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., et al. (2015). A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil. Steril.* *103*: 11–21.
- Fortune, J.E. (2003). The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* *78*: 135–163.
- Fowler, R.E., Fox, N.L., Edwards, R.G., and Steptoe, P.C. (1978). Steroid production from 17 α -hydroxypregnenolone and dehydroepiandrosterone by human granulosa cells in vitro. *Reproduction* *54*: 109–117.
- Glister, C., Groome, N.P., and Knight, P.G. (2003). Oocyte-Mediated Suppression of Follicle-Stimulating Hormone- and Insulin-Like Growth Factor-Induced Secretion of Steroids and Inhibin-Related Proteins by Bovine Granulosa Cells In Vitro: Possible Role of Transforming Growth Factor α 1. *Biol. Reprod.* *68*: 758–765.
- Gore, A.C. (2008). Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.* *29*: 358–374.
- Gore, A.C., Chappell, V.A., Fenton, S.E., Flaws, J.A., Nadal, A., Prins, G.S., et al. (2015). EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr. Rev.* *36*: E1–E150.
- Graceli, J.B., Dettogni, R.S., Merlo, E., Niño, O., da Costa, C.S., Zanol, J.F., Ríos Morris, E.A., Miranda-Alves, L. and Denicol, A.C. (2020). The impact of endocrine-disrupting chemical exposure in the mammalian hypothalamic-pituitary axis. *Mol. Cell. Endocrinol.* *518*: 110997.
- Gregoraszczyk, E.L., Rak, A., Kawalec, K., and Ropstad, E. (2008). Steroid secretion following exposure of ovarian follicular cells to single congeners and defined mixture of polybrominated dibenzoethers (PBDEs), *p,p'*-DDT and its metabolite *p,p'*-DDE. *Toxicol. Lett.* *178*: 103–109.

- Hannon, P.R., Brannick, K.E., Wang, W., and Flaws, J.A. (2015). Mono(2-Ethylhexyl) Phthalate Accelerates Early Folliculogenesis and Inhibits Steroidogenesis in Cultured Mouse Whole Ovaries and Antral Follicles. *Biol. Reprod.* *92*: 1–11.
- Hannon, P.R. and Flaws, J.A. (2015) The effects of phthalates on the ovary. *Front. Endocrinol.* *6*: 8.
- Hanukoglu, I. (1992). Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *43*: 779–804.
- Harnett, K.G., Chin, A., and Schuh, S.M. (2021). BPA and BPA alternatives BPS, BPAF, and TMBPF, induce cytotoxicity and apoptosis in rat and human stem cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* *216*: 112210.
- Heikinheimo, O., and Gibbons, W. (1998). The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Mol. Hum. Reprod.* *4*: 745–56.
- Herbst, A.L., Ulfelder, H., and Poskanzer, D.C. (1971). Adenocarcinoma of the Vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N. Engl. J. Med.* *284*: 878–881.
- Hojo, H., Aoyama, H., Takahashi, K.L., Shimizu, N., Araki, M., Takizawa, Y., et al. (2006). Two-generation reproduction toxicity study in rats with 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (p,p'-DDT). *Congenit. Anom.* *46*: 105–114.
- Hu, M.C., Hsu, H.J., Guo, I.C., and Chung, B. (2004). Function of *Cyp11a1* in animal models. *Mol. Cell. Endocrinol.* *215*: 95–100.
- Hunt, P.A., Koehler, K.E., Susiarjo, M., Hodges, C.A., Ilagan, A., Voigt, R.C., et al. (2003). Bisphenol A Exposure Causes Meiotic Aneuploidy in the Female Mouse. *Curr. Biol.* *13*: 546–553.
- Chao, H.H., Zhang, X.F., Chen, B., Pan, B., Zhang, L.J., Li, L., Sun, X.F., Shi, Q.H., Shen, W. (2012). Bisphenol A exposure modifies methylation of imprinted genes in mouse oocytes via the estrogen receptor signaling pathway. *Histochem. Cell. Biol.* *137*: 249-59.
- Chiaratti, M.R., Garcia, B.M., Carvalho, K.F., Macabelli, C.H., Ribeiro, F.K. da S., Zangirolamo, A.F., et al. (2018). Oocyte mitochondria: role on fertility and disease transmission. *Anim. Reprod.* *15*: 231–238.
- Chmelíková E., Sedmíková, M., Ješeta M. and Němeček, D. (2018). Endocrine disruptors: General characteristics, chemical nature and mechanisms of action. A review. *Med. J. Cell Biol.* *6*: 135–139.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. (1999). Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans *73*:131–182.
- Kang, Y., Zhang, R., Yu, K., Han, M., Pei, J., Chen, Z., et al. (2022). Organochlorine pesticides (OCPs) in corals and plankton from a coastal coral reef ecosystem, south China sea. *Environ. Res.* *214*: 114060.
- Kavlock, R., Barr, D., Boekelheide, K., Breslin, W., Breyse, P., Chapin, R., Gaido, K., Hodgson, E., Marcus, M., Shea, K., Williams, P. (2006). NTP-CERHR Expert Panel Update on the Reproductive and Developmental Toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reprod. Toxicol.* *22*: 291-399.
- Kelce, W.R., Monosson, E., Gamcsik, M.P., Laws, S.C., Gray, L.E. Jr. (1994). Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *126*:276-85.
- Kiyama, R., and Wada-Kiyama, Y. (2015). Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environ. Int.* *83*: 11–40.
- Kleine, B., and Rossmanith, W.G. (2016). Hormones and the Endocrine System: Textbook of Endocrinology. Springer, Cham.

- Knapczyk-Stwora, K., Nynca, A., Swigonska, S., Paukzsto, L., Jastrzebski, J.P., Witek, P., et al. (2022). Effects of neonatal methoxychlor exposure on the ovarian transcriptome in piglets. *Anim. Reprod. Sci.* *238*: 106956.
- Kuriyama, S.N., Talsness, C.E., Grote, K., Chahoud, I. (2005). Developmental exposure to low dose PBDE 99: effects on male fertility and neurobehavior in rat offspring. *Environ. Health Perspect.* *113*:149-54.
- Lee, S.G., Kim, J.Y., Chung, J.Y., Kim, Y.J., Park, J.E., Oh, S., et al. (2013). Bisphenol A Exposure during Adulthood Causes Augmentation of Follicular Atresia and Luteal Regression by Decreasing 17 β -Estradiol Synthesis via Downregulation of Aromatase in Rat Ovary. *Environ. Health Perspect.* *121*: 663–669.
- Listing of POPs in the Stockholm Convention.
<https://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/ListingofPOPs/tabid/2509/Default.aspx>
- Malott, K.F., and Luderer, U. (2021). Toxicant effects on mammalian oocyte mitochondria. *Biol. Reprod.* *104*: 784–793.
- Manikkam, M., Haque, M.M., Guerrero-Bosagna, C., Nilsson, E.E., and Skinner, M.K. (2014). Pesticide Methoxychlor Promotes the Epigenetic Transgenerational Inheritance of Adult-Onset Disease through the Female Germline. *PLOS ONE* *9*: e102091.
- Marsh, J.M. (1976). The Role of Cyclic AMP in Gonadal Steroidogenesis I. *Biol. Reprod.* *14*: 30–53.
- Meyer, N., Santamaria, C.G., Müller, J.E., Schumacher, A., Rodriguez, H.A., and Zenclussen, A.C. (2019). Exposure to 17 α -ethinyl estradiol during early pregnancy affects fetal growth and survival in mice. *Environ. Pollut.* *251*: 493–501.
- Mihalas, B.P., Redgrove K.A., McLaughlin E.A., and Nixon B. (2017). Molecular Mechanisms Responsible for Increased Vulnerability of the Ageing Oocyte to Oxidative Damage. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017: 4015874
- Mlynarčíková, A., Nagyová, E., Ficková, M. and Scsuková, S. (2009). Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes. *Toxicol. In Vitro.* *23*: 371-7.
- Morito, K., Hirose, T., Kinjo, J., Hirakawa, T., Okawa, M., Nohara, T., Ogawa, S., Inoue, S., Muramatsu, M., and Masamune Y. (2001). Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol. Pharm. Bull.* *24*: 351-6.
- Motta, P.M., Nottola, S.A., Makabe, S., and Heyn, R. (2000). Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum. Reprod.* *15*: 129–147.
- Mueller, J.K., and Heger, S. (2014). Endocrine disrupting chemicals affect the Gonadotropin releasing hormone neuronal network. *Reprod. Toxicol.* *44*: 73–84.
- Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slusarewicz, P., et al. (1995). Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J. Cell Biol.* *131*: 1715–1726.
- Nestler, J. (1997). Role of Hyperinsulinemia in the Pathogenesis of the Polycystic Ovary Syndrome, and Its Clinical Implications. *Semin. Reprod. Med.* *15*: 111–122.
- Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., and McIntush, E.W. (2000). Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. *Physiol. Rev.* *80*: 1–29.
- OSPAR Convention. Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic. <https://www.ospar.org>.
- Overview in the Stockholm Convention.
<https://www.pops.int/Implementation/IndustrialPOPs/BDEs/Overview/tabid/5371/Default.aspx>

- Pan, M.H., Wu, Y.K., Liao, B.Y., Zhang, H., Li, C., Wang, J.L., et al. (2021). Bisphenol A Exposure Disrupts Organelle Distribution and Functions During Mouse Oocyte Maturation. *Front. Cell Dev. Biol.* 9:661155.
- Parrott, J.L., Blunt, B.R. (2005). Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. *Environ. Toxicol.* 20: 131-41.
- Patel, S., Zhou, C., Rattan, S., and Flaws, J.A. (2015). Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on the Ovary. *Biol. Reprod.* 93: 20, 1–9.
- Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J.A., and Minutolo, F. (2014). Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids* 90: 13–29.
- Pennell P.B. (2013). Pregnancy, epilepsy, and women's issues. *Continuum* 19:697-714.
- Peretz, J., Craig, Z.R., and Flaws, J.A. (2012). Bisphenol A Inhibits Follicle Growth and Induces Atresia in Cultured Mouse Antral Follicles Independently of the Genomic Estrogenic Pathway. *Biol. Reprod.* 87 : 63, 1–11.
- Peretz, J., Gupta, R.K., Singh, J., Hernández-Ochoa, I., and Flaws, J.A. (2011). Bisphenol A Impairs Follicle Growth, Inhibits Steroidogenesis, and Downregulates Rate-Limiting Enzymes in the Estradiol Biosynthesis Pathway. *Toxicol. Sci.* 119: 209–217.
- Picton, H., Briggs, D., and Gosden, R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 145: 27–37.
- Picton, H.M. (2001). Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 55: 1193–1210.
- Pocar, P., Brevini, T., Fischer, B., and Gandolfi, F. (2003). The impact of endocrine disruptors on oocyte competence. *Reprod. Camb. Engl.* 125: 313–25.
- Pope, G.S., and Wright, H.G. (1954). Oestrogenic isoflavones in red clover and subterranean clover. *Chemistry and Industry* 33: 1019-1020.
- Przybylińska, P.A., and Wyszowski, M. (2016). Environmental contamination with phthalates and its impact on living organisms. *Ecol. Chem. Eng. S* 23: 347–356.
- Rahman, F., Langford, K.H., Scrimshaw, M.D., and Lester, J.N. (2001). Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Sci. Total Environ.* 275: 1–17.
- Rattan, S., and Flaws, J.A. (2019). The epigenetic impacts of endocrine disruptors on female reproduction across generations. *Biol. Reprod.* 101: 635–644.
- Reynolds, L., and Redmer, D. (1999). Growth and development of the corpus luteum. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54: 181-91.
- Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., et al. (2007). *In vivo* effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod. Toxicol.* 24: 199–224.
- Rohr, J.R. (2021). The Atrazine Saga and its Importance to the Future of Toxicology, Science, and Environmental and Human Health. *Environ. Toxicol. Chem.* 40: 1544–1558.
- Rossiter, R.C., and Beck, A.B. (1966). Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavone in subterranean clover. II. Effect of phosphate supply. *Australian Journal of Agricultural Research* 17: 447-456.
- Rubin, B.S., Murray, M.K., Damassa, D.A., King, J.C., Soto, A.M. (2001). Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ. Health Perspect.* 109:675-80.

- Safe, S. (1984). Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polybrominated Biphenyls (PBBs): Biochemistry, Toxicology, and Mechanism of Action. *Crit. Rev. Toxicol.* *13*: 319-95.
- Schrager, S., Potter B.E. (2004). Diethylstilbestrol Exposure. *Am. Fam. Physician* *69*:2395-400.
- Shanle, E.K., and Xu, W. (2011). Endocrine Disrupting Chemicals Targeting Estrogen Receptor Signaling: Identification and Mechanisms of Action. *Chem. Res. Toxicol.* *24*: 6–19.
- Singletary, K. W., Frey, R. S., and Li, J. Y. (2002). Differential effects of genistein on cell proliferation, cyclin B1, and p34cdc2 in transformed and nontransformed human breast cells. *Pharm. Biol.* *40*: 35-42.
- Sirotkin, A.V., and Harrath, A.H. (2014). Phytoestrogens and their effects. *Eur. J. Pharmacol.* *741*: 230–236.
- Skinner, M.K. (2008). What is an epigenetic transgenerational phenotype?: F3 or F2. *Reprod. Toxicol.* *25*: 2–6.
- Sonnenschein, C., and Soto, A.M. (1998). An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *65*: 143–150.
- Soto A.M., and Sonnenschein C. (2010). Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nat. Rev. Endocrinol.* *6*: 363–370.
- Souter, I., Smith, K.W., Dimitriadis, I., Ehrlich, S., Williams, P.L., Calafat, A.M., Hauser, R. (2013). The association of bisphenol-A urinary concentrations with antral follicle counts and other measures of ovarian reserve in women undergoing infertility treatments. *Reprod Toxicol.* *42*: 224-31.
- Stocco, D.M., and Clark, B.J. (1996). Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev.* *17*: 221-44.
- Stockholm Convention. (2001). Stockholm Convention on persistent organic pollutants (POPs). <https://chm.pops.int>.
- Stockholm Convention – methoxychlor. UNEP-POPS-NewPOPs-Factsheet-19-20240726.English.pdf.
- Stockholm Convention. <https://chm.pops.int/TheConvention/Overview/tabid/3351/Default.aspx>.
- Stockholm Convention.(2001). <https://www.pops.int/TheConvention/ThePOPs/tabid/673/Default.aspx>
- Stockholm Convention. (2001). <https://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/ListingofPOPs/tabid/2509/Default.aspx>
- Supornsilchai, V., Jantararat, C., Nosoognoen, W., Pornkunwilai, S., Wacharasindhu, S., and Soder, O. (2016). Increased levels of bisphenol A (BPA) in Thai girls with precocious puberty. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* *29*: 1233–1239.
- Swain, J.E., and Pool, T.B. (2008). ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. *Hum. Reprod. Update* *14*: 431–446.
- Tao, Y.H., Sharif, N., Zeng, B.-H., Cai, Y.Y., and Guo, Y.X. (2015). Lateral ventricle injection of orexin-A ameliorates central precocious puberty in rat via inhibiting the expression of MEG3. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *8*: 12564–12570.
- Thompson, I.R., and Kaiser, U.B. (2014). GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* *385*: 28–35.
- Toktay, E., Selli, J., Gurbuz, M.A., Tastan, T.B., Ugan, R.A., Un, H., et al. (2020). Effects of soy isoflavonoids (genistein and daidzein) on endometrial receptivity. *Iran. J. Basic Med. Sci.* *23*: 1603–1609.
- Urseler, N., Bachetti, R., Biolé, F., Morgante, V., and Morgante, C. (2022). Atrazine pollution in groundwater and raw bovine milk: Water quality, bioaccumulation and human risk assessment. *Sci. Total Environ.* *852*: 158498.

- U.S. EPA. (1970). U.S. Environmental Protection Agency. Overview of Endocrine Disruption. <https://www.epa.gov/endocrine-disruption>.
- U.S. EPA. (2000). <https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-09/documents/methoxychlor.pdf>.
- U.S. EPA. (2000). https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-113201_1-Oct-00.pdf.
- U.S. EPA. <https://www.epa.gov/aboutepa/our-mission-and-what-we-do>.
- U.S. EPA. <https://www.epa.gov>.
- Wang, Y., and Qian, H. (2021). Phthalates and Their Impacts on Human Health. *Healthcare* 9: 603.
- Wu, C.T., and Morris, J.R. (2001). Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence. *Science* 293: 1103–1105.
- Wu, K., Li, Y., Pan, P., Li, Z., Yu, Y., Huang, J., et al. (2020). Gestational vinclozolin exposure suppresses fetal testis development in rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 203: 111053.
- Wuttke, W., Jarry, H., and Seidlova-Wuttke, D. (2010). Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones* 9:9-15.
- Xing, J., Zhang, S., Zhang, M., and Hou, J. (2022). A critical review of presence, removal and potential impacts of endocrine disruptors bisphenol A. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 254 : 109275.
- Xu, C., Chen, J.A., Qiu, Z., Zhao, Q., Luo, J., Yang, L., et al. (2010). Ovotoxicity and PPAR-mediated aromatase downregulation in female Sprague–Dawley rats following combined oral exposure to benzo[a]pyrene and di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol. Lett.* 199: 323–332.
- Yang, Y., Yang, L., Chen, H., Tan, H., Yang, J., Sun, F., et al. (2022). Low-level alternative halogenated flame retardants (AHFRs) in indoor dust from Adelaide, South Australia decades since national legislative control on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). *Sci. Total Environ.* 826: 154123.
- Young, J.M., and McNeilly, A.S. (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction* 140: 489–504.
- Yu, Y., Lin, B., Liang, W., Li, L., Hong, Y., Chen, X., Xu, X., Xiang, M., Huang, S. (2018). Associations between PBDEs exposure from house dust and human semen quality at an e-waste areas in South China-A pilot study. *Chemosphere* 198:266-273.
- Zalko, D., Jacques, C., Duplan, H., Bruel, S., and Perdu, E. (2011). Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 82: 424–430.
- Zama, A.M., and Uzumcu, M. (2009). Fetal and Neonatal Exposure to the Endocrine Disruptor Methoxychlor Causes Epigenetic Alterations in Adult Ovarian Genes. *Endocrinology* 150: 4681–4691.
- Zama, A.M., and Uzumcu, M. (2010). Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on female reproduction: An ovarian perspective. *Front. Neuroendocrinol.* 31: 420–439.
- Zhang, T., Zhou, X., Xu, A., Tian, Y., Wang, Y., Zhang, Y., et al. (2020). Toxicity of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) on rodent male reproductive system: A systematic review and meta-analysis of randomized control studies. *Sci. Total Environ.* 720: 137419.
- Zhang, Y.J., Guo, J.L., Xue, J., Bai, C.L., and Guo, Y. (2021). Phthalate metabolites: Characterization, toxicities, global distribution, and exposure assessment. *Environ. Pollut.* 291: 118106.