



Vpliv kemičnih motilcev endokrinega sistema na epigenetiko in delovanje jajčnika

Effect of endocrine disrupting chemicals on epigenetics and ovarian function

Tina Kek,^{1,2} Alja Videtič Paska,³ Ksenija Geršak^{1,4}

Izvleček

Ljudje smo vsakodnevno izpostavljeni različnim kemičnim motilcem endokrinega sistema (KMES). Izpostavljenost KMES je povezana s številnimi motnjami in boleznimi reproduktivnega sistema, vendar njihov vpliv še ni natančno pojasnjen. Opisanih je več različnih mehanizmov preko katerih KMES lahko motijo delovanje organizma. Reproductivno zdravje je odvisno od pravilnega prenatalnega razvoja jajčnikov, ki je ključen za njihovo pravilno delovanje. Ugotovitve epidemioloških študij in študij na živalih kažejo, da prenatalna izpostavljenost KMES lahko povzroči različne bolezni reproduktivnega sistema pozneje v življenju, kar povzema hipoteza sindroma ovarijske disgeneze. Eden od vzročnih mehanizmov delovanja KMES za pojav sindroma ovarijske disgeneze naj bi bile tudi epigenetske spremembe. V članku, ki je pregled literature na tem področju, je predstavljena vloga epigenetskih procesov (DNA metilacija, ne-kodirajoča RNA, histonske modifikacije) v toksičnem delovanju KMES na reproduktivni sistem.

Abstract

Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) are ubiquitous in everyday life, but their possible adverse effects on reproductive health have not been fully elucidated. EDCs exposure has been linked to a range of reproductive disorders. Many presumed mechanisms by which EDCs can cause reproductive toxicity have been described. Reproductive health depends on the normal prenatal development of properly functioning ovaries. A growing body of evidence from epidemiological and animal studies suggests that exposure to EDCs prenatally can cause a variety of reproductive disorders later in life, such as those described in the ovarian dysgenesis syndrome hypothesis. The mechanisms that mediate the effects of EDCs on female reproduction are deemed to include epigenetic modifications. In this literature review, we discuss the role of epigenetics (DNA methylation, non-coding RNAs, histone tail modifications) in the reproductive toxicity of EDCs.

¹ Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

² Center za klinične raziskave, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

³ Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

⁴ Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Korespondenca / Correspondence: Tina Kek, e: tina.kek@gmail.com

Ključne besede: kemični motilci endokrinega sistema; jajčnik; epigenetika; sindrom ovarijske disgeneze; prenatalna izpostavljenost

Key words: endocrine disrupting chemicals; ovary; epigenetics; ovarian dysgenesis syndrome hypothesis; prenatal exposure

Prispelo / Received: 22. 8. 2023 | **Sprejeto / Accepted:** 2. 2. 2024

Citirajte kot/Cite as: Kek T, Videtič Paska A, Geršak K. Vpliv kemičnih motilcev endokrinega sistema na epigenetiko in delovanje jajčnika. Zdrav Vestn. 2024;93(3–4):121–34. DOI: <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.3487>



Avtorske pravice (c) 2024 Zdravniški Vestnik. To delo je licencirano pod Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno 4.0 mednarodno licenco.

1 Uvod

Od industrijske revolucije se v našem okolju kopiči veliko kemikalij, kar je povezano z naraščanjem raznovrstnih zdravstvenih težav v populaciji. Ena od skupin okoljskih kemikalij so kemični motilci endokrinega sistema (KMES), ki motijo delovanje hormonov (1).

Po definiciji Svetovne zdravstvene organizacije gre pri KMES za: *od zunaj vneseno (eksogena) snov ali mešanico snovi, ki spremeni delovanje endokrinega sistema in zato povzroči različne škodljive zdravstvene posledice pri posamezniku, njegovem organizmu ali (sub)populacijah*. KMES se razlikujejo od kemikalij z endokrino aktivnostjo (KEA) po tem, da KEA, kljub neposrednemu ali posrednemu medsebojnemu delovanju z endokrinim sistemom ne povzročajo nujno škodljivih posledic na organizmu (2).

KMES se nalagajo v okolju in so sestavina industrijskih odpadkov, onesnažene vode in široke uporabe pesticidov. KMES so prisotni tudi v farmacevtskih proizvodih, izdelkih za osebno nego, kozmetiki in antiseptičnih pripravkih, so sestavina plastike, notranjih plasti pločevink za hrano in pijačo, vodovodnih napeljav (vodne pipe) in nekaterih vrst zobnih zalivk. Nekateri KMES (parabeni) se široko uporabljajo kot antimikrobni konzervansi v procesirani hrani (3-5). Obstajajo tudi številni naravni KMES, kot so fitoestrogeni, ki so jih našli v soji, lucerni in detelji ter težke kovine, kot so svinec, živo srebro in kadmij (6,7).

KMES, ki se kopičijo v okolju, vstopijo v prehranjevalno verigo. Njihova vsebnost se po prehranjevalni verigi povečuje. Tako imajo plenilci, kot so orli, tuljuni, polarni medvedi in ljudje največje količine KMES v telesu. Od več kot 85.000 različnih registriranih kemikalij jih je približno 1.000 znanih kot možni KMES (6,8,9).

Zgodnje raziskovalno delo se je začelo z ekološkimi študijami, ki so pokazale povezavo med kompleksno mešanico različnih eksogenih snovi, motnjami endokrinega sistema in reproduktivnega razvoja pri ribah, plazilcih, pticah in sesalcih. Preiskovane snovi so imele estrogenske, androgenske, antiandrogenske in antitiroidne vplive (9). Rezultati laboratorijskih raziskav zadnjih dveh desetletij pri več različnih okoljskih kemikalijah potrjujejo ob dovolj visoki ravni izpostavljenosti potencial za povzročanje motenj endokrinega sistema. V študijah na glodalcih je izpostavljenost KMES povzročila tipične okvare na jajčnikih. V njih so našli številne atretične folikle, a nobenih rumenih teles (*lat. corpora lutea*), ki so kazalnik ovulacij. Ob tem je bila porušena hormonska cikličnost, ugotovljene pa

visoke ravni testosterona. V vezivnem tkivu jajčnikov so nastale vakuole z lipidnimi kapljicami in hemoragične ciste. Lipidne vakuole naj bi nastale zaradi motene steroidogeneze ob znižanih ravneh luteinizirajočega hormona (LH), hemoragične ciste pa naj bi bile posledica neposrednega učinka KMES (npr. dietilstilbestrol, DES) na celice. Študije so tudi pokazale nižje stopnje zanositve pod vplivom KMES z zmanjšano kakovostjo jajčnih celic ter z visokim številom foliklov z več jajčnimi celicami (*angl. multiple-oocyte follicles, MOF*), ki so kazalnik skrajšanega reproduktivnega obdobja (7).

Epidemiološke študije kažejo na to, da KMES vplivajo tako na žensko kot na moško reproduktivno zdravje. V enem od zgodnejših poročil so avtorji opisali padec v parametrih kakovosti semena (zmanjšano število semenčic in manjši volumen) pri moških v zadnjih 50 letih in jih povezovali z vplivi KMES (10). Bolezenske spremembe zaradi vpliva KMES se pri moških skupinsko poimenujejo kot sindrom testikularne disgenese (STD). Čeprav manj natančno opredeljen kot STD, se pri ženskah uporablja izraz sindrom ovarijske disgenese (*angl. ovarian dysgenesis syndrome, ODS*). Sindrom ovarijske disgenese je skupno ime za motnje ženskega reproduktivnega sistema, ki so posledica izpostavljenosti KMES. Po ameriških podatkih je stopnja neplodnosti, ki je lahko posledica sindroma ovarijske disgenese, med letoma 1982 in 2002 narasla z 11 % na 15 % (11), lahko pa na porast vpliva tudi sprememba življenjskega sloga, ki je posredno povezana z vplivi KMES (7).

KMES podobno kot hormoni delujejo v že zelo nizkih koncentracijah, posebej v obdobju embrionalnega razvoja (9,12). Endokrini sistem ohranja ravnovesje v telesu preko sproščanja hormonov iz žlez, ki se uravnavajo s povratnimi sistemi zank. Kadar je moten hormonski sistem, ki uravnava reprodukcijo, stresni odziv, energijsko ravnotežje, metabolizem, rast in elektrolitsko ravnotežje, ker ne more delovati primerno, to vodi v neravnotežje organizma in v razvoj bolezni (6). Čas izpostavljenosti je pomemben za ugotavljanje vpliva KMES na organizem. Čeprav organizem v nobenem obdobju življenja ni imun na vplive KMES, je čas embrionalnega razvoja najbolj ranljiv. Koncept fetalne oziroma razvojne osnove za bolezni v odrasli dobi pojasnjuje, kako sta prenatalno in zgodnje postnatalno obdobje razvoja zelo občutljiva na okoljske vplive, saj ti lahko povzročajo nepovratne spremembe v izražanju genov in spremenijo razvijajoči se organizem. Posledice

teh sprememb lahko vodijo v motnje v razvoju organizma in v pojavljanje bolezni kasneje v življenju (6). Ta koncept oziroma t.i. Barkerjeva hipoteza se je razvila ob opazovanju, da prenatalna izpostavljenost pomanjkljivi prehrani vodi do različnih zdravstvenih težav v odrasli dobi, kot so na primer presnovne in srčno-žilne bolezni (7). Ti pozni stranski učinki so posledica epigenetskih sprememb (12). Organizem je v prenatalnem obdobju najbolj ranljiv zaradi velike občutljivosti na zelo majhne koncentracije KMES. Te količine odraslemu človeku ne bi škodovala zaradi prisotnosti razvitih detoksifikacijskih mehanizmov, kot so imunski sistem, antioksidanti in jetrni metabolizem (12).

Reproduktivna toksičnost KMES je predmet številnih raziskav. Čeprav so že opisali več različnih mehanizmov škodljivega vpliva KMES, njihova vloga v epigenetskih mehanizmih še ni natančno razjasnjena (13). Namen članka, ki je sicer le pregled literature, je predstaviti glavne epigenetske mehanizme, ključne procese v jajčniku, ki so ranljivi za epigenetske učinke KMES, in povzeti možne poti epigenetske toksičnosti za posamezne KMES, vendar brez toksikološke ocene tveganja ob izpostavljenosti KMES.

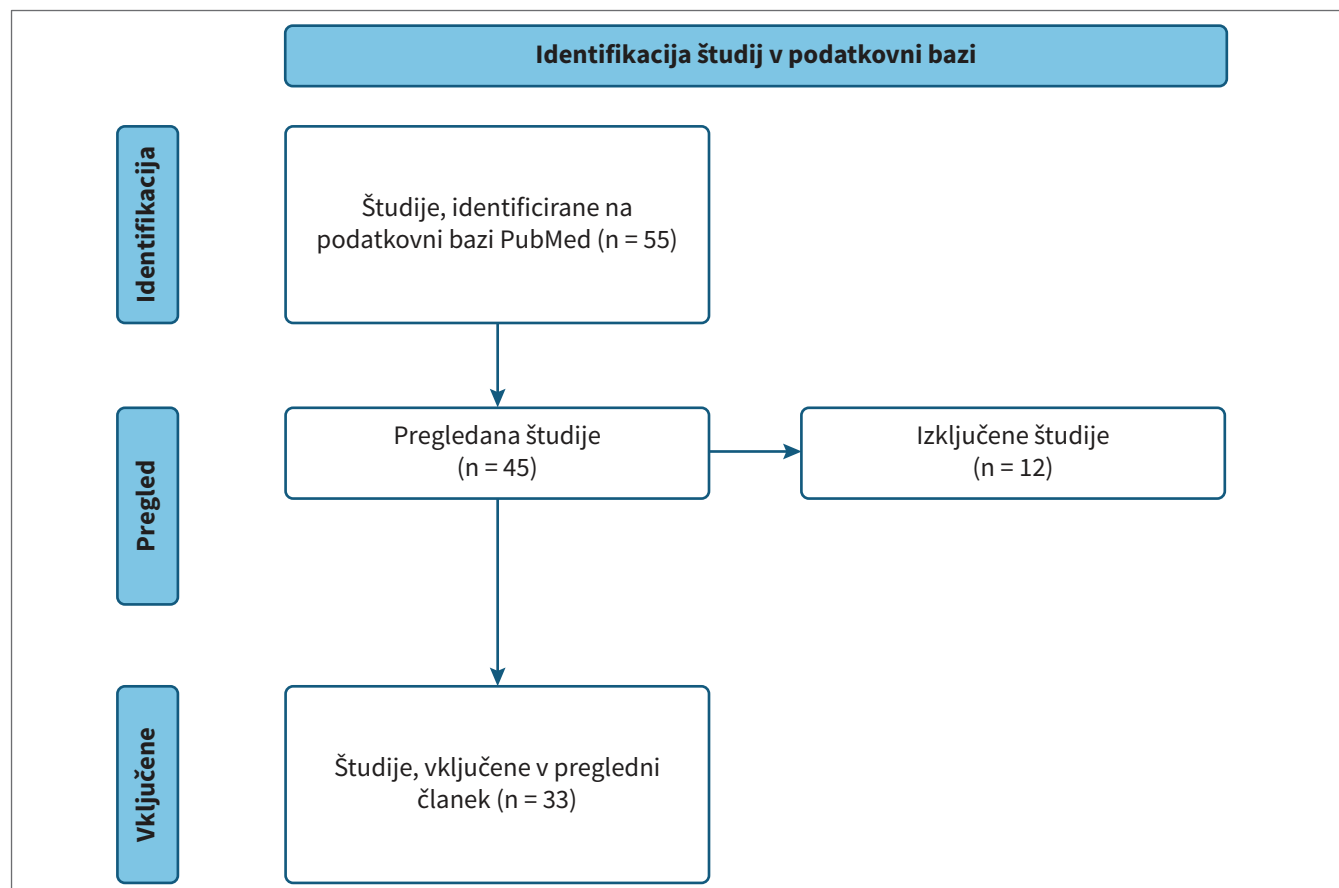
2 Metode

2.1 Iskanje literature

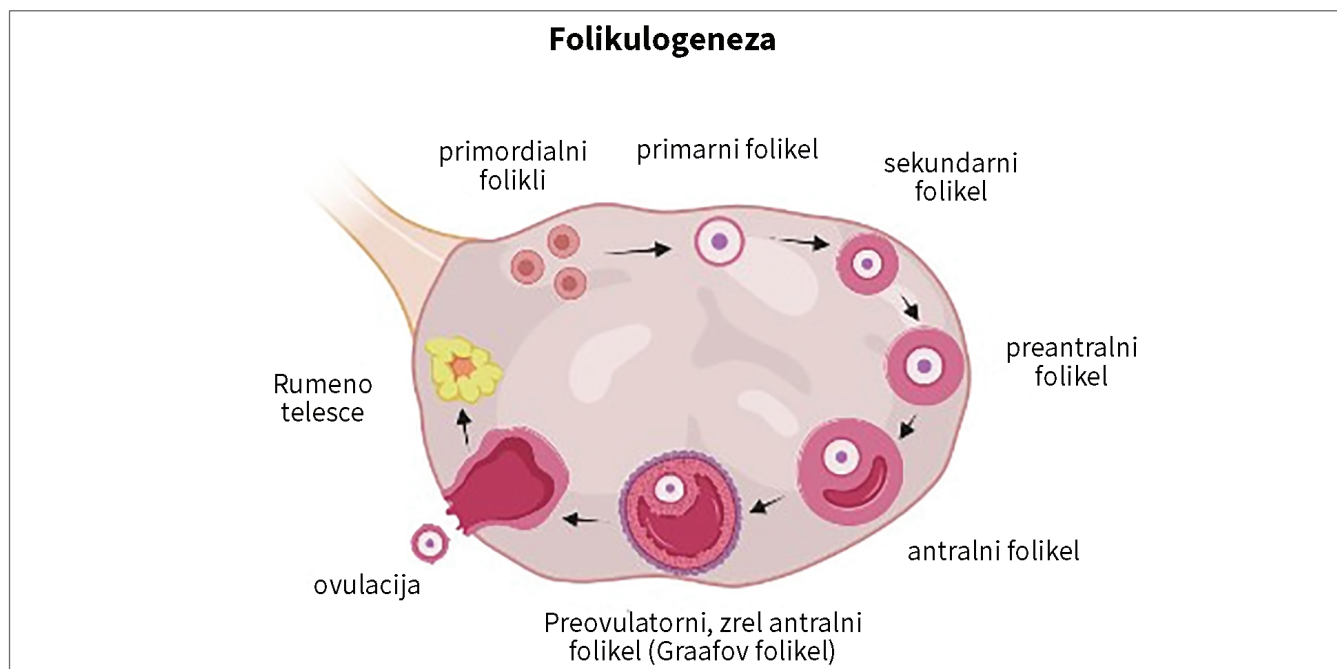
Literaturo smo iskali na elektronski podatkovni bazi Nacionalne medicinske knjižnice (*angl.* National Library of Medicine, PubMed) z uporabo ključnih besed po besednjaku za indeksiranje strokovnih publikacij (*angl.* Medical Subject Headings, MeSH). Za iskanje študij, objavljenih v obdobju 2000–2023, smo uporabili ključne besede *jajčnik* in *kemični motilci endokrinega sistema* ter *epigenetika*.

2.2 Vključitvena in izključitvena merila

V pregledni članek smo vključili randomizirane kontrolirane študije, študije primerov s kontrolami, presečne študije, pilotne študije in kohortne študije pri ljudeh in živalih. Članke, ki niso bili napisani v angleščini, smo izključili. Članki so bili pregledani glede ustreznosti njihovega raziskovalnega področja in kakovosti raziskave. Da smo lahko potrdili strokovno primernost in pridobili podatke, smo vključene članke v celoti prebrali (Slika 1).



Slika 1: Shematski prikaz identifikacije in pregleda primernih publikacij.



Slika 2: Razvoj jajčne celice – folikulogeneza.

Vir: ustvarjeno z BioRender.com.

2.3 Pridobivanje podatkov

Za naš pregledni članek smo iz vključenih študij pridobili naslednje podatke: karakteristike vključenih študij (prvi avtor, leto publikacije), zasnova raziskave, preiskovani KMES in glavne ugotovitve.

3 Rezultati

3.1 Reprodukativno zdravje in kemični motilci endokrinega sistema (KMES)

Razvoj normalno delujočih jajčnikov je temelj reprodukativnega zdravja žensk. Zgodnje motnje razvoja jajčnikov imajo lahko dolgoročne posledice z možnim pojavom bolezni tudi pozneje v odraslem življenju. Čedalje več dokazov kaže na to, da prenatalna izpostavljenost okoljskim kemikalijam lahko povzroči različne bolezni in motnje v delovanju jajčnikov in drugih organov reprodukativnega sistema, kar zajema definicija sindroma ovarijske disgeneze. Empirični dokazi za sindrom ovarijske disgeneze se še zbirajo. Raziskovalci raziskujejo vpliv KMES na plodnost, zdravje nosečnic in razvoj bolezni, ki se pojavijo v odrasli dobi.

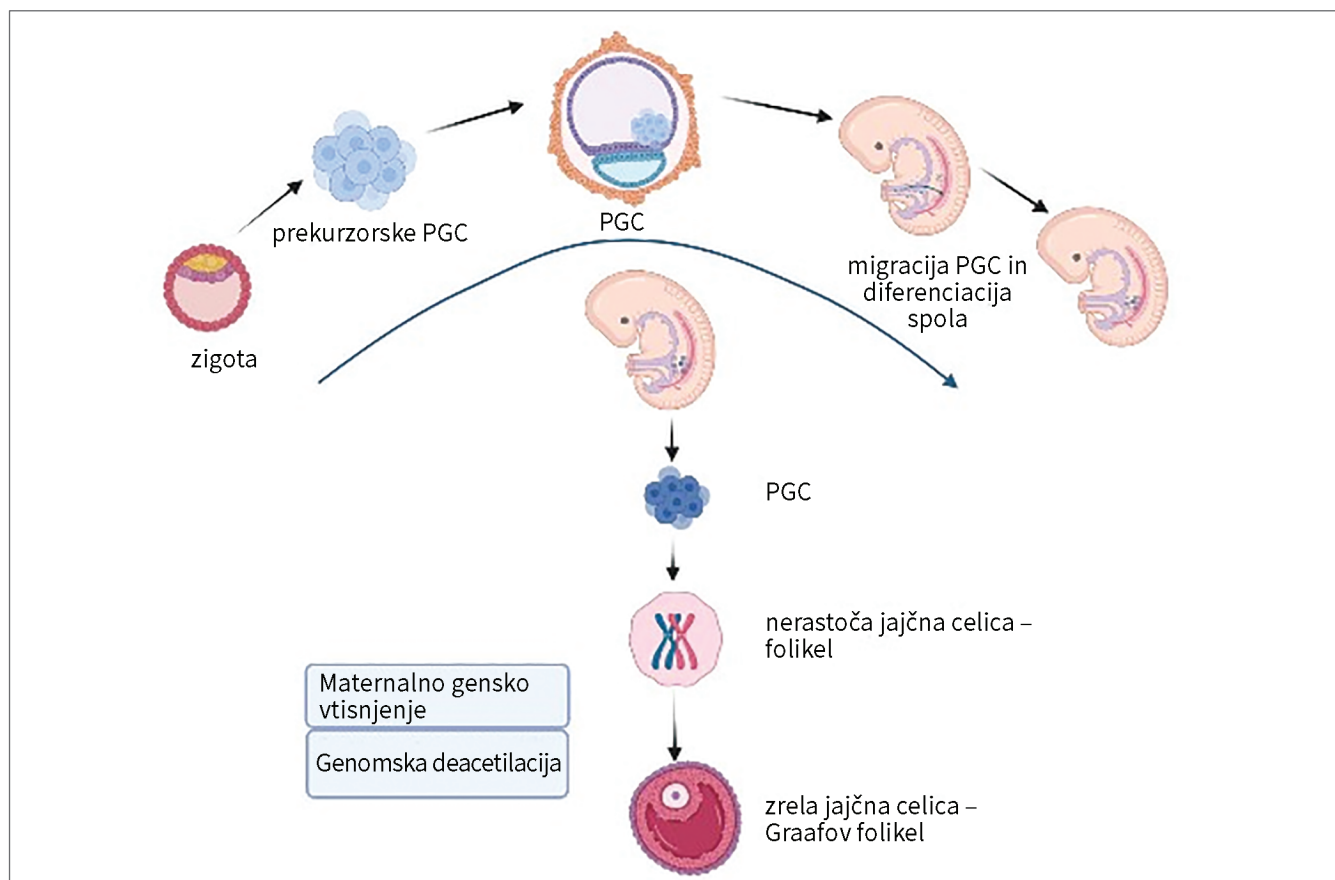
Motnje v razvoju jajčnikov se lahko kažejo kot strukturne ali funkcijske spremembe, vključujoč embriogenezo, folikulogenezo (Slika 2) in signalne poti steroidnih hormonov. Možen je tudi širši spekter posledic, ki zajema prirojene anomalije, anovulacije ali motnje menstruacije.

Predpostavlja se, da motnje reprodukcije in ginekološke bolezni, kot je na primer endometrioza, povečajo tveganje za razvoj raka preko sprememb v epigenetiki.

Razvoj jajčnikov se začne v 3. embrionalnem tednu kot vzdolžna spolna grebena medialno od razvijajočih se sečil. Hkrati se pojavijo v steni rumenjakovega mehurčka praspolne celice (primordialne klične celice) in potujejo v naslednjih 2 tednih ameboidno navzgor do spolnih grebenov. V 6. embrionalnem tednu, ko vdrejo v spolna grebena, skupaj z namnoženimi epitelnimi celicami v primitivnih kličnih povezkih, oblikujejo indiferentne gonade. Ženske praspolne celice (oogoniji) se mitotično delijo in po 12. embrionalnem tednu lahko že vstopijo v prvo mejotsko delitev. Kot diploidne nezrele jajčne celice (primarni oociti ali oociti 1. reda) skupaj z epitelnimi celicami oblikujejo prenatalno zalogo primordialnih jajčnih foliklov.

Embriogeneza in gametogeneza sta pod močnim vplivom steroidnih hormonov, ki so poleg receptorjev aril ogljikovodika, encimov citokrom p450 in homeostaze ščitnice glavna tarča KMES (14). Natančno so bila opisana 4 časovna okna, ko je jajčnik posebej občutljiv na delovanje KMES:

- embrionalno okno, ko se diferencirajo primitivne gonade;
- nastajanje primordialnih foliklov;
- začetek rekrutiranja foliklov;
- mejotska delitev, ki se začne v embrionalnem obdobju in se zaključi ob oploditvi jajčne celice (15).



Slika 3: Shema razvoja jajčnikov, jajčne celice in epigenetskih mehanizmov. Povzeto po Biswas et al., 2021 (17).

Legenda: PGC – primordialne germinalne celice.

Vir: ustvarjeno z BioRender.com.

Epigenetske spremembe v teh ključnih procesih predstavljajo pomembno vez med okoljskimi dejavniki – KMES – in pravilnim razvojem in delovanjem jajčnika (Slika 3) (16).

3.2 Mehanizmi delovanja kemičnih motilcev endokrinega sistema

Način vnosa KMES v organizem vpliva na njihovo biološko razpoložljivost. Primarne poti izpostavljenosti pri ljudeh so oralna (preko zaužitja), dermalna in inhalacijska. Pred vstopom v krvni obtok se nekateri zaužiti KMES nepopolno metabolizirajo v jetrih, kar vodi do večje biološke razpoložljivosti. Nemetabolizirana oblika je pri večini KMES njihova najbolj aktivna oblika. Po vstopu v krvni obtok KMES lahko dosežejo in delujejo na tarčne celice.

KMES vplivajo na endokrini sistem preko različnih mehanizmov, ki spremenijo sintezo in metabolizem hormonov (Slika 4).

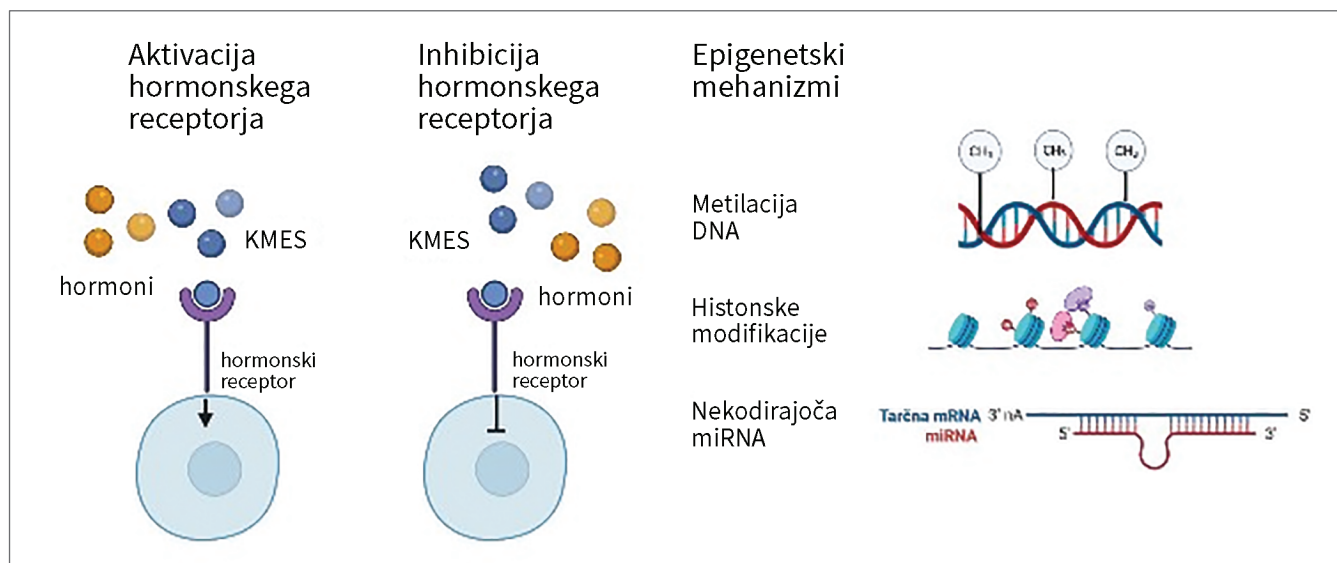
Najpogostejše preučevana pot je preko interakcije s hormonskimi receptorji družine jedrnih receptorjev (JR)

(ERbeta – estrogenski receptor beta, ERalfa – estrogenski receptor alfa), z receptorji androgenov in receptorji ščitničnih hormonov (1). JR se aktivirajo z ustreznimi ligandi, ki so endogeni hormoni ali KMES. V naslednji stopnji se preko specifičnih elementov, odzivnih na hormone, vzpostavijo vezave na DNA. Vezava liganda na membransko vezane JR pa aktivira tudi negenomske poti, kot so PI3K/AKT in MAPK kinazna kaskada, kar vodi v dodatne spremembe različnih encimov v celicah (npr. kinaze ali fosfataze).

Drugi receptor, ki je vključen v delovanje KMES, je aril ogljikovodikov receptor, ki se aktivira z organskimi kemikalijami in nadzira prepisovanje genov na podoben način kot JR.

Poleg vplivov na hormonsko delovanje povzročajo KMES tudi dolgoročne spremembe v izražanju genov (1). Te spremembe so predvsem posledica epigenetskih mehanizmov.

Izraženost posledic izpostavljenosti KMES je odvisna od obdobja izpostavljenosti. Za razvoj transgeneracijskega učinka je kritično, ko se razvijajo zarodne celice. Spremembe na ravni zarodnih celic se prenašajo



Slika 4: Mehanizmi delovanja kemičnih motilcev endokrinega sistema (KMES).

Legenda: KMES – kemični motilci endokrinega sistema; DNA – deoksiribonukleinska kislina; RNA – ribonukleinska kislina.
Vir: ustvarjeno z BioRender.com.

v razvijajoča se somatska tkiva. Zaradi nezrelosti detoksifikacijskih procesov pri plodu in novorojenčku so ti posebej občutljivi na delovanje KMES. Njihove zarodne celice so tarčne celice za s KMES povzročene multi- in transgeneracijske učinke (8).

3.3 Epigenetski mehanizmi in njihov pomen v razvoju jajčnika in jajčne celice

Pred več kot 60 leti je Conrad Waddington prvi definiral epigenetiko kot interakcijo genov z njihovim okoljem, kar lahko vpliva na izražanje fenotipa. Leta 1956 je opisal, da okoljski stimulus, kot je npr. izpostavljenost kemikalijam ali temperaturni spremembi, povzročijo pri vinski mušici z enakim genetskim zapisom različne dedne spremembe v strukturi prsnega koša in kril (1). Nova odkritja in tehnike v molekularni biologiji so omogočila razumevanja pojava, ki ga je opisal Waddington. Ob tem se je razvilo novo področje molekularne biologije - epigenetika.

Epigenetika preučuje mitotske in mejotske dedne spremembe, ki spreminjajo izražanje genov brez sprememb v zaporedju nukleotidov v DNA.

Genomsko reprogramiranje oziroma spremembe v epigenetskih oznakah se zgodijo med dvema različnima obdobjema reproduktivnega življenja: po oploditvi jajčne celice (embriogeneza) in med razvojem primordialnih jajčnih foliklov (gametogeneza oz. pri ženskem plodu oogeneza). Ti obdobji reprogramiranja predstavljata izbris genetskega vtisnjenja in spremembo celične sposobnosti za diferenciacijo (toti/pluripotentnosti)

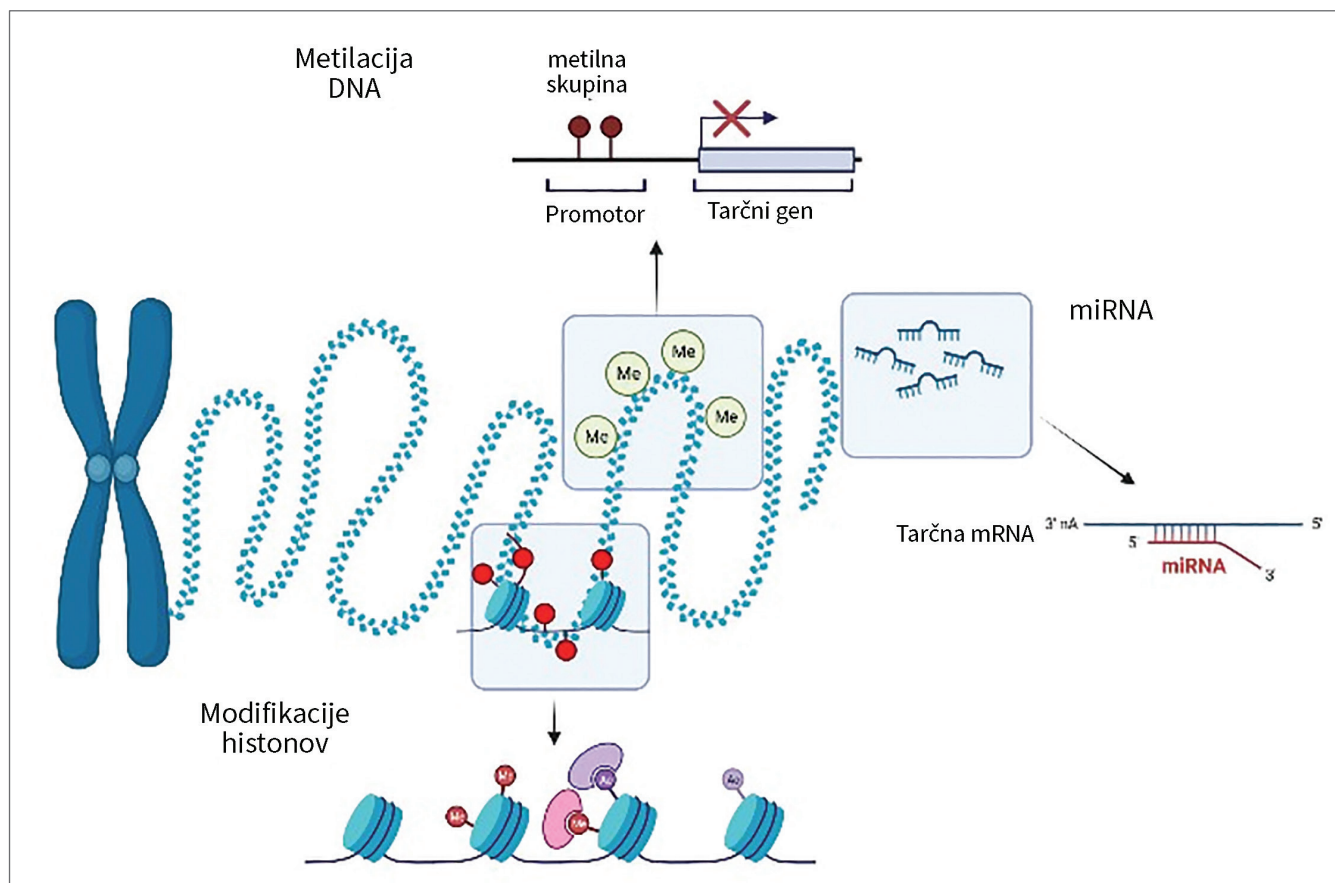
(Slika 3). V obeh primerih reprogramiranja se odstranijo obstoječe zaščitne epigenetske oznake, s čimer se genetski material izpostavi aktiviranju mobilnih genetskih elementov. Zato se mora proces za ohranjanje genomske stabilnosti natančno nadzorovati. Po reprogramiranju sledi ponovna postavitve epigenetskih oznak na specifičnih lokusih (18).

Glavni 3 epigenetski mehanizmi so metilacija DNA, postranslacijske modifikacije repov histonskih proteinov in delovanje nekodirajočih RNA (Slika 5) (8). Izpostavljenost KMES lahko v jajčniku spremeni te epigenetske mehanizme, kar vodi v spremenjeno izražanje genov (1,7).

3.3.1 Metilacija DNA

Metilacija DNA poteka na citozinih v dinukleotidih citozin-gvanin (CpG) in igra vlogo v genomskem vtisnjenju (*angl.* imprinting), zaviranju retrotranspozonov, X-kromosomski inaktivaciji in uravnavanju genskega izražanja. CpG so področja DNA, kjer v linearnem zaporedju baz v smeri 5' proti 3' citozinskemu nukleotidu sledi gvaninski nukleotid. Dinukleotidov CpG je v genomu približno 1 %. Večjo gostoto CpG najdemo v segmentih DNA, imenovanih otočki CpG, ki so povezani z zaporedji za uravnavanje genov.

Metilacija DNA vpliva na vezavo transkripcijskih faktorjev in v večini primerov zmanjša izražanje genov. Če metilacija DNA ni prisotna, se transkripcijski faktorji lahko vežejo na regulacijska zaporedja. Tako izražanje genov ni ovirano (1,8).



Slika 5: Epigenetski mehanizmi.

Legenda: DNA – deoksiribonukleinska kislina; mRNA – informacijska (*angl.* messenger) ribonukleinska kislina; miRNA – mikro ribonukleinska kislina.

Vir: ustvarjeno z BioRender.com.

Metilacija DNA se mitotsko deduje, kar pomeni, da se ohranja pri deljenju celic. Ta proces imenujemo ohranjajoča metilacija (*angl.* maintenance methylation). Dolgo časa je veljalo, da je metilacija DNA stabilna epigenetska sprememba in da je reverzibilnost mogoča samo v primerih pasivne demetilacije, ko so encimi DNA metil-transferaze odsotni ali ne delujejo.

Med razvojem se v primordialnih kličnih oz. zarodnih celicah (*angl.* primordial germ cells, PGC) dogajajo velike epigenetske prerazporeditve (19). V PGC, ki so nediferencirane praspolne celice, se genomske vzorce metilacije v naslednjih razvojnih fazah spremeni specifično glede na spol (20). Izbris somatskih vzorcev DNA metilacije v PGC se zgodi, ko te celice vstopijo v razvijajoče se jajčnike oz. ženske gonade. Nekaj vtisnjenih genov se demetilira tudi pozneje, na primer IGF2R (*angl.* insulin like growth factor 2 receptor) se v nekaterih PGC demetilira, preden te kolonizirajo genitalni greben (21). Ko PGC migrirajo v gonade, postanejo oogoniji (ženske zarodne celice oz. ženske praspolne celice), ki se mitotsko delijo in se nato v prvi mejotski delitvi razvijejo v primarne jajčne

celice (primarni oocit oz. oocit 1. reda). Z uporabo protiteles proti metiliranemu citozinu so dokazali, da stopnja metilacije v delečih se oogonijih ostaja nizka. Dokler jajčne celice niso hormonsko aktivirane, ostajajo hipometilirane, za razliko od folikularnih celic, ki imajo enake vzorce DNA metilacije kot somatska tkiva (22). Čeprav se demetilacija v PGC zgodi v poteku celotnega genoma, pa obstajajo tudi področja, kot npr. t.i. minorni sateliti in veliki vmesni nuklearni elementi, ki ostajajo metilirani. Med embrionalnim razvojem se demetilirajo promotorji za gene in gene kodirajoče regije, katerih izražanje je specifično za posamezno tkivo. To nakazuje, da metilacija DNA nadzira in časovno usklajuje prepisovanje genov.

Metilacija DNA je kot mehanizem utišanja najbolj raziskan epigenetski proces pri genomske vtisnjenju, saj večina genomskega vtisnjenja potrebuje metilacijo DNA. Študije na miših kažejo, da se genomske vtisnjenje pojavi v postnatalni fazi oogeneze. Čas izbrisa genomskega vtisnjenja v PGC je ključnega pomena za to, da imajo celice obeh spolov enako epigenetsko stanje pred dokončno diferenciacijo v moške in ženske zarodne celice,

ko se tvorijo nova starševska vtisnjenja (23). Vtisnjenje reprogramira zarodne celice in povzroča monoalelno izražanje vtisnjenih genov. To specifično gensko izražanje, ki izhaja od staršev, običajno nadzoruje metilacija DNA, ki se zgodi med oogenezo. Vzorec genskega vtisnjenja se dokonča šele v zadnji fazi razvoja jajčne celice, ko je ta pripravljena za ovulacijo. Zato je gensko vtisnjenje izredno pomemben genetski nadzor prepisovanja genov za normalen razvoj zdravega potomca (24).

3.3.2 Postranslacijske modifikacije histonov

Histoni so proteinske komponente nukleosomov, iz katerih je sestavljen kromatin evkariontskih celic. Približno 146 baznih parov DNA, ki so oviti okrog osmih histonskih molekul, sestavlja osnovno enoto, imenovano nukleosom. Vsak nukleosom vsebuje 2 podenoti, ki vsebujeta histone H2A, H2B, H3 in H4 (centralni histoni) z vezavnim histonom H1, ki deluje kot stabilizator in povezuje nukleosome. Moč vezave med DNA in histoni določa stanje kromatina, ki je lahko sproščeno (nizka moč vezave med DNA in histoni) ali zgoščeno (visoka moč vezave med DNA in histoni). Stanje kromatina je pomembno za nadzor izražanja genov in se spreminja s postranslacijskimi spremembami repov centralnih histonov (*angl.* posttranslational modifications, PTM) (1). Te modifikacije med drugimi vključujejo acetilacijo lizina, metilacijo lizina in arginina ter fosforilacijo serina in treonina. Acetilacija lizina je povezana s sprostitvijo kromatina, kar omogoči dostopanje transkripcijskim faktorjem. Deacetilacija lizina vodi v kondenzacijo kromatina, kar prepreči prepis in izražanje genskega zapisa. Podobno sta metilacija in fosforilacija povezani z aktiviranjem in utišanjem genov, odvisno od položaja modificirane aminokisline v histonskem repu (7). Nadzor izražanja genov se vodi preko velikih proteinskih kompleksov, ki dodajajo, odstranjujejo ali prepoznajo PTM oznake na kromatinu (1). Ta epigenetska kontrola je ključnega pomena za razvoj jajčnega folikla. Najbolj preučevane so acetilacije lizina, metilacije arginina in lizina, fosforilacije serina in treonina ter ubikvitacije lizina (24).

3.3.3 Histonska acetilacija in deacetilacija

Malo je znanega o histonskih acetilacijah in deacetilacijah med tvorbo jajčnega folikla. Rezultati dosedanjih študij nakazujejo, da imajo PGC med migracijo do genitalnega grebena transkripcijsko aktiven kromatin, in sicer podobno kot somatske celice. Ob vstopu v genitalni greben PGC prehodno ustvarijo hiperaktivne kromatinske vzorce (25). Med zorenjem folikla in rastjo jajčne

celice se pojavi histonska acetilacija v specifičnih vzorcih. Vzorci histonske acetilacije so različni, če primerjamo zoreči primarni oocit in zrelo jajčno celico (sekundarni oocit ob ovulaciji). Na primer histon v perinuklearni regiji je visoko acetiliran pri zreli, ne pa pri rastoči jajčni celici. Acetilacija večinoma aktivira prepisovanje genov.

Histonska acetilacija naj bi igrala vlogo tudi pri različnih kromatinskih procesih med mejozo. Študije kažejo, da so histonske acetilacije potrebne za pravilen potek mejoze (26).

Primarnih mehanizmov nadzornih poti histonskih acetilacij in deacetilacij zaenkrat še ne razumemo popolnoma. Domneva se, da so histonske acetilacije označevalec celičnega spomina. V procesu genomskega reprogramiranja se histoni deacetilirajo, kar izbriše informacije o aktivnih genih (t.i. celični spomin) zato, da nastanejo nediferencirane, totipotentne zigote za naslednjo generacijo (24).

3.3.4 Histonske metilacije

Od vseh histonskih modifikacij pa so metilacije najbolj kompleksne. Lizinski ostanki so mesta metilacije različnih stopenj (mono-, di- ali trimetilacije), kar vodi v utišanje ali izražanje gena. Argininski ostanki so lahko mono- ali dimetilirani (27). Med folikulogenezo igrajo histonske modifikacije pomembno vlogo pri nadzoru kromatinske strukture in izražanja genov, posebej pri zorenju jajčne celice med mejozo. Povečanje di- in trimetilacije H3K9 (lizin na 9. mestu histona H3) naj bi bilo vključeno v transkripcijsko utišanje celotnega genoma med rastjo jajčne celice, metilacija H3K4 (lizin na 4. mestu histona H3) pa naj bi bila vključena v genomske spremembe kromatinske konfiguracije, ki ni povezana s transkripcijo. Natančni mehanizmi, ki povezujejo razvoj jajčnega folikla in histonske modifikacije zaenkrat še niso znani (24).

3.3.5 Histonske fosforilacije in druge histonske modifikacije

Med nastajanjem jajčnega folikla igrajo pomembno vlogo tudi druge histonske modifikacije, kot sta fosforilacija in ubikvitinacija. Te modifikacije so domnevno sposobne prenesti epigenetske informacije med mitozo in mejozo (28). Veliko ovarijskih genov je preko teh tipov modifikacij povezanih z razvojem primordialnih foliklov. Izgleda, da je namen teh procesov nadzorovati prepisovanje genov in pripravljati nastanek naslednjega paketa izražanja genov. Predpostavljamo, da je urejeno in pravilno epigenetsko reprogramiranje PGC pred

migracijo in med njo iz rumenjakove vrečke v spolni greben nujno za nastanek sekundarnih oocitov z ustreznim epigenotipom, ki podpira normalen razvoj.

Med folikulogenezo so fosforilacije centralnih histonov povezane z različnimi kromatinskimi aktivnostmi, tudi s zgoščanjem kromatina (29). Opazovanja pri miših so pokazala, da je fosforilacija histona H3 vključena v nadzor oblike kromatina med mejotskim zorenjem in v začetek zgoščevanja kromatina med mejozo (24,30).

Histonska ubikvitacija in druge histonske modifikacije so prav tako regulacijski dejavniki med razvojem folikla. Znano je, da so ubikvitirani histoni H2A povezani s transkripcijskim utišanjem velikih kromatinskih regij med mejozo tako pri moških kot pri ženskah. Signaliziranje med jajčno celico in folikularnimi celicami je ključni regulator prehoda iz primarnega v sekundarni antralni folikel. Hormoni iz granuloznih folikularnih celic lahko kontrolirajo specifične histonske modifikacije tako pri jajčni celici kot pri folikularnih celicah. Histonske modifikacije promotorske regije nekaterih genov (steroidogeni akutni regulacijski protein, receptor LH, relaksin, Niemann-Pick C1, alfa podenota inhibina in nekateri geni theka) so bile povezane s spremembami biološke sinteze reproduktivnih hormonov (24,31).

Po hipotezi t.i. histonske kode, tudi same specifične kombinacije histonskih modifikacij, uravnavajo genetski zapis. Tako lahko ena oblika modifikacije histona vpliva na obliko in pogostost modifikacij na drugem mestu. Med različnimi histonskimi modifikacijami obstaja izrazita sinergija in koordinacija (32).

3.4 Nekodirajoče RNA

Samo približno 1 % genomske informacije se prevede v proteine. Napredki pri sekvenciranju in tehnikah molekularne biologije so vodili k odkritju, da se 70–90 % genoma, ki ne kodira proteinov, prepiše v nekodirajoče RNA (*angl.* non coding RNA, ncRNA) (1). Poleg samega odkritja ncRNA so nedavno prepoznali tudi njen pomen v bioloških procesih.

NcRNA so prepisi brez jasno odprtega bralnega okvirja, zato ne kodirajo proteinov, ampak uravnavajo izražanje drugih genov v obliki *cis* in *trans*. NcRNA variirajo v velikosti od mikro RNA (miRNA) (15–21 nukleotidov) in malih RNA (100–200 nukleotidov), do velikih RNA molekul (> 200 nukleotidov). Vključene so v vitalne funkcije, kot so X-kromosomska inaktivacija, genomsko vtisnjenje, transpozonsko utišanje ter razvoj na diferenciacija (7).

Med nastajanjem jajčnega folikla sta večinoma prisotna dva razreda ncRNA: miRNA in piRNA (*angl.*

Piwi-interacting RNA). MiRNA so izražene povsod, medtem ko najdemo piRNA samo v PGC oz. praspolnih celicah in v nekaj tipih somatskih celic jajčnika. MiRNA pomembno uravnavajo transkripcijo in postranskripcijsko utišanje genov. Pomembne so za deljenje PGC. Raven izražanja večine miRNA se ohranja med celotnim razvojem PGC, razen nekaterih miRNA (miR-17-5p, -18, -19a, -19b) in se postopoma zmanjšuje po 12. embrionalnem tednu, ko PGC končajo mitotsko proliferacijo in se pripravijo za vstop v profazo mejoze (33). To kaže, da igrajo nekatere miRNA pomembno vlogo v zgodnjem razvoju ženskih zarodnih celic oz. oogonijev. Enako velja tudi za piRNA, ki naj bi ohranjala genomsko stabilnost s tem, da zavira aktivnost mobilnih genetskih elementov (24,34).

V zorenje jajčnih foliklov je vključena tudi ncRNA, ki nadzoruje izražanja genov, ključnih za rast jajčnih celic in endokrino funkcijo jajčnika.

Domneva se, da zgodaj v razvoju jajčnih celic različno izražanje retrotranspozonov in sinteza siRNA (*angl.* small interfering RNA) povzročita preko RNAi poti (*angl.* RNA interference pathway) postopno remodeliranje kromatina. V rastočih jajčnih celicah naj bi večina izraženih siRNA in piRNA zavirala retrotranspozone preko različnih tarčnih genetskih komponent (35). Študije so bile zaenkrat narejene samo na živalskih modelih, zato natančni nadzorni mehanizmi supresije retrotranspozonov ostajajo neznanka, prav tako učinki zaviranja retrotranspozonov na jajčno celico in razvoj jajčnega folikla (24). Tang je s sodelavci poročal, da so miRNA ključne za zorenje jajčnih celic (36). S primerjavo profila izražanja miRNA med razvojem jajčnih celic pri miših so se pokazale dinamične spremembe v izražanju miRNA. Izguba miRNA je vodila v zaustavitev zorenja jajčne celice v prvi celični delitvi, najverjetneje zaradi motenj v tvorbi delitvenega vretena. Ob tem so ugotovili, da je bil velik delež maternalnih genov neposredno in posredno pod nadzorom miRNA. To kaže, da so maternalne miRNA ključni regulator zorenja jajčne celice (36). Ob tem je bilo ugotovljenih več novih miRNA, ki so vključene v nadzor foliklov, kot so miR-93 (37), miR-132 in miR-212 (38). Odkritje njihovih tarčnih genov bo osvetlilo vlogo miRNA v razvoju foliklov (24).

Poleg njihove vloge v nadzoru izražanja posameznih genov so ncRNA ključne tudi v genomskem utišanju genov in v uravnavanju vtisnjenja genov. Ugotovitve, da približno polovica vseh vtisnjenih genov kodira ncRNA in, da je v vtisnjenih domenah pogosto prisotna ncRNA, dokazujejo njihovo pomembno vlogo v epigenetski regulaciji. Tako ncRNA omogočajo monoalelno izražanje specifičnih regij genoma (39). Vendar je njihova vloga v PGC še precej neraziskana (24).

4 Razprava

Raziskave epigenetskih vplivov KMES na jajčnik so doslej večinoma potekale na živalskih modelih in z opazovanjem posledic izpostavljenosti (Priloga 1). Vendar pregled dosedanjih opazovanj pri človeku (Priloga 2) kaže na vpliv prenatalne izpostavljenosti KMES na delovanje jajčnikov v odraslem organizmu. To podpira hipotezo o nastanku sindroma ovarijske disgeneze. Izpostavljenost KMES po izsledkih raziskav lahko povzroča transgeneracijske epigenetske spremembe. Obstajajo pa tudi študije, ki vpliva na plodnost in epigenetski status po izpostavljenosti niso ugotovile (40-42).

Kot smo že opisali pri mehanizmi delovanja, je vpliv KMES najverjetneje posledica vezave KMES na hormonski receptor. Vezava povzroči zaviranje fiziološkega delovanja hormona in pojav značilnih histoloških sprememb na jajčnikih. Spremembe so pojav foliklov z več jajčnimi celicami kot kazalnikom motenega delovanja jajčnikov (43-48) in z antagonističnim vplivom na ER: pretirana oziroma premajhna sinteza hormona, ki se kaže v zastoju zorenja jajčnih foliklov (49). T.i. KMES receptorski kompleksi lahko povzročajo hipermetilacijo v promotorski regiji različnih genov, kar vodi v njihovo utišanje in s tem v različne zdravstvene posledice (50,51). Nekatere raziskave so poročale o neposrednem epigenetskem vplivu (hipometilacija) KMES na ER (43), druge o hipometilaciji ER-odzivnih genov, ki so povezani tudi s procesom pretiranega izražanja protoonkogenov in karcinogenezo (52). Raziskava Hall in Korach je ugotavljala povečano izražanje ER-alfa v kulturi rakavih celic jajčnika, ki so bile izpostavljene KMES (genistein, bisfenol A, HPTE) (53). Epigenetske študije raka so poudarile vlogo ER tudi v deljenju in širjenju rakavih celic. O povezavi med izpostavljenostjo KMES in pojavom ginekoloških vrst raka in rakom dojke je poročalo že več raziskav (54-57). V raziskavi Zama in Uzumcu (2009) so bile podgane pred rojstvom izpostavljene dvema različnima odmerkoma metoksiklora (MXC). Po rojstvu so pri odraslih podganah, ki so bile izpostavljene visokim odmerkom MXC (100 mg/kg/d), ugotavljali hipermetilacijo genov za ERbeta, DNA metiltransferazo 3-beta in z nosečnostjo povezanega proteina A (43). Utišanje gena za ER-beta in povečana aktivnost gena za DNMT sta bila povezana s pojavom raka jajčnika (6,58).

Izpostavljenost KMES povzroča tudi znižane ravni Anti-Müllerjevega hormona (AMH). AMH vpliva na diferenciacijo in razvoj reproduktivnega sistema in je občutljiv označevalec staranja jajčnikov (59). Ob izpostavljenosti bisfenolu A (BPA) so pri odrasli ribi cebrici

ugotavljali znižanje izražanja AMH preko hipermetilacije njegovega promotorja (60).

Znani predstavnik KMES, BPA, spreminja izražanje gena za DNMT, kar vpliva na celotno stopnjo metilacije in zmanjša izražanje t.i. reproduktivnih genov, kot so geni za ER, LH in receptor FSH (61-63). BPA moti izločanje estrogena preko vpliva na izražanje miRNA, kar vodi v motenje v razvoju jajčnih foliklov (64-66) in do neplodnosti (67). Ob tem je bilo ugotovljeno, da BPA poveča izražanje miR-224 v granuloznih celicah jajčnika in poveča raven estradiola v serumu. Tako posredno zmanjša izločanje FSH, kar prav tako negativno vpliva na plodnost (64).

Spremembe v metilaciji DNA in zato motnje v razvoju jajčnika so povezane s številnimi KMES (Priloga 1). Poleg BPA so to tetraklorobenzo-p-dioksin (TCDD) (68,69), ftalati (di-2-ethylheksil ftalat - DEHP) (70-74) in vinklozolinom (41,74). Na spremembe v ncRNA vpliva vinklozolin (75) in na histonske modifikacije di-ethylstilbestrol (76) in klordekon (77).

Asociacijske študije humanega epigenoma so omogočile nepristransko oceno epigenetskih sprememb v povezavi z okoljskimi dejavniki (78). Ena od njih je poročala o spremenjenem metilomu posteljice ob izpostavljenosti KMES (ftalatom) (79). Več raziskav je povežalo izpostavljenost KMES s spremembami metilacije DNA izbranih genov v posteljici (80) in popkovnični krvi (81-83). Geni v teh spremenjenih področjih so povezani z vnetnim odzivom, kancerogenezo, endokrinim sistemom, moško plodnostjo (84-86) in andogenim odgovorom (86).

Kljub številnim raziskavam, ki ugotavljajo spremenjeni epigenom novorojenčka ob prenatalni izpostavljenosti KMES, pa je še malo znanega o dolgotrajnih vplivih prenatalne in dolgotrajne postnatalne izpostavljenosti KMES v nizkih odmerkih na delovanje jajčnika v odrasli dobi ter na celotno reproduktivno zdravje (87). Številne študije odrasle populacije povezujejo izpostavljenost KMES z motnjami reproduktivnega zdravja. Toda zaenkrat še ni dovolj podatkov o vzročnih epigenetskih spremembah (3,88,89). Zato se postavlja tudi vprašanje o količini izpostavljenosti, ki povzroči škodljive posledice tako ob prenatalni kot postnatalni izpostavljenosti ter vprašanje o tem kdaj, v kateri generaciji, se morebitni stranski učinki izpostavljenosti dejansko izrazijo. KMES, kot je na primer BPA, imajo šibko estrogensko aktivnost. Bisphenol A se na estrogenske receptorje (alfa in beta) veže z 1.000- do 10.000-krat manjšo afiniteto kot naravni hormon estradiol (90). Vendar so raziskave pokazale vplive BPA tudi pri nizkih odmerkih (100 µg/kg/dan), kar je bilo

vsaj delno pojasnjeno s tem, da BPA lahko vpliva tudi preko drugih (npr. epigenetskih) in ne zgolj preko klasičnih poti, ki se običajno sprožijo z estrogenom (91,92).

Nizka izpostavljenost KMES lahko povzroči spremenjen epigenom, ki se pri posamezniku fenotipsko izrazi ali pa ne (43). Različne raziskave, ki so proučevale izpostavljenost mešanici različnih KMES, so pokazale, da posamezni KMES sami ne povzročajo posledic, vendar lahko postanejo škodljivi ob součinkovanju mešanice različnih KMES (93-95). Nasprotno pa raziskava, ki je preučevala prisotnost in estrogeno aktivnost mešanice KMES v vzorcih slovenskih voda, na celičnem modelu (Hela 9903) ni ugotavljala endokrine aktivnosti pri vseh preučevanih mešanicah KMES (96).

Ob široki uporabi KMES smo ljudje v življenju izpostavljeni različnim in številnim KMES. Zato veliko raziskovalcev predpostavlja, da dolgotrajna izpostavljenost povzroči številne epigenetske spremembe, ki se v življenju kopičijo in simptomi se opazijo šele ob dodatnem stresnem dejavniku. Vse večji pa je poudarek na ugotovitvi, da je večja ranljivosti organizma povezana že s prenatalno izpostavljenostjo. Kritičen čas izpostavljenosti za nastanek epigenetskih transgeneracijskih sprememb in s tem fenotipa je čas diferenciacije spola gonad, ki je pri ljudeh med 6–18 tedni nosečnosti. Nosečnice v prvi polovici nosečnosti so tako najverjetneje najbolj občutljiva populacija za okoljsko povzročene epigenetske transgeneracijske spremembe (97).

Vseeno pa imamo na podlagi dosedanjih raziskav zaenkrat še malo vpogleda v zanesljive epigenetske vplive KMES v populaciji. Razlog za to je poleg zahtevne pravilne ocene izpostavljenosti populacije tudi kompleksnost raziskovanja neposredne vzročne povezave med izpostavljenostjo KMES in spremembami epigenoma. Potrebne so nadaljnje toksikološke raziskave ocene tveganja, ki bodo vključevale okoljsko relevantne odmerke KMES, saj se v dosedanjih raziskavah opazovane epigenetske spremembe in njihovo izražanje razlikujejo glede na odmerke vključenih KMES (Priloga 1).

5 Zaključek

Reproduktivno zdravje žensk pomembno vpliva tako na življenje posameznice kot celotne družbe. Temelji reproduktivnega zdravja v veliki meri izvirajo iz prenatalnega obdobja. Izpostavljenost KMES zadnji 2 desetletji vse pogostejše povezujemo z različnimi reproduktivnimi in drugimi boleznimi. Letni strošek zdravljenja zdravstvenih težav, ki so povezane s KMES, so v Evropi ocenili na 163 bilijonov (98).

KMES oponašajo hormone. Hkrati isti hormoni, ki nastajajo v jajčnikih, uravnavajo tudi delovanje KMES. Njihov vpliv je tako dvojen. Razvijajoči se kot tudi odrasli jajčnik z rastočimi folikli potrebuje vpliv številnih dejavnikov, ki se prostorsko in časovno natančno uravnavajo. Danes vemo, da vpliv nekaterih dejavnikov nadzirajo različni epigenetski mehanizmi, kot so metilacija DNA, modifikacije histonov in ncRNA. Kljub številnim raziskavam obstaja v povezavi med KMES, motnjami v razvoju in delovanju jajčnika ter vzročnimi epigenetskimi spremembami še veliko nejasnosti. Ob naraščajočem številu znanih in potencialnih KMES, s katerimi se srečujemo v vsakdanjem življenju, je pomembno, da se zavedamo, kako te kemikalije vplivajo na živa bitja v kratkoročnem in dolgoročnem času. Predvsem pa je poznavanje dolgoročnih vplivov pogoj, da si ustvarimo zdravju varno okolje.

Izjava o navzkrižju interesov

Avtorice nimamo navzkrižja interesov.

Spletna priloga

Priloga 1: Pregled raziskav epigenetskega vpliva kemičnih motilcev endokrinega sistema (KMES) pri živalih. Datoteka je dostopna na spletni povezavi: <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.3487>.

Priloga 2: Pregled raziskav epigenetskega vpliva kemičnih motilcev endokrinega sistema (KMES) pri ljudeh. Datoteka je dostopna na spletni povezavi: <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.3487>.

Literatura

- Alavian-Ghavanini A, Rüegg J. Understanding Epigenetic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals: From Mechanisms to Novel Test Methods. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018;122(1):38-45. DOI: [10.1111/bcpt.12878](https://doi.org/10.1111/bcpt.12878) PMID: 28842957
- Perharič L. Navodila za izdelavo ocene tveganja za zdravje ljudi zaradi izpostavljenosti kemijskim in mikrobiološkim dejavnikom iz okolja z izbranimi poglavji in praktičnimi primeri I. del. Ljubljana: NIJZ; 2017 [cited 2024 Feb 12]. Available from: <https://nijz.si/publikacije/navodila-za-izdelavo-ocene-tveganja-za-zdravje-ljudi-zaradi-izpostavljenosti-kemijskim-in-mikrobioloskim-dejavnikom-iz-okolja-z-izbranimi-poglavji-in-prakticnimi-primeri-i-del/>.
- Karwacka A, Zamkowska D, Radwan M, Jurewicz J. Exposure to modern, widespread environmental endocrine disrupting chemicals and their effect on the reproductive potential of women: an overview of current epidemiological evidence. *Hum Fertil (Camb)*. 2019;22(1):2-25. DOI: [10.1080/14647273.2017.1358828](https://doi.org/10.1080/14647273.2017.1358828) PMID: 28758506
- Oliveira MM, Martins F, Silva MG, Correia E, Videira R, Peixoto F. Use of Parabens (Methyl and Butyl) during the Gestation Period: Mitochondrial Bioenergetics of the Testes and Antioxidant Capacity Alterations in Testes and Other Vital Organs of the F1 Generation. *Antioxidants*. 2020;9(12):1302. DOI: [10.3390/antiox9121302](https://doi.org/10.3390/antiox9121302) PMID: 33353071

5. Strømme K, Lyche JL, Moltu SJ, Müller MH, Blakstad EW, Almaas AN, et al. High urinary concentrations of parabens and bisphenol A in very low birth weight infants. *Chemosphere*. 2021;271. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2021.129570](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129570) PMID: 33453489
6. Walker DM, Gore AC. Transgenerational neuroendocrine disruption of reproduction. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(4):197-207. DOI: [10.1038/nrendo.2010.215](https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.215) PMID: 21263448
7. Uzumcu M, Zama AM, Oruc E. Epigenetic mechanisms in the actions of endocrine-disrupting chemicals: gonadal effects and role in female reproduction. *Reprod Domest Anim*. 2012;47:338-47. DOI: [10.1111/j.1439-0531.2012.02096.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02096.x) PMID: 22827390
8. Xin F, Susiarjo M, Bartolomei MS. Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation? *Semin Cell Dev Biol*. 2015;43:66-75. DOI: [10.1016/j.semcdb.2015.05.008](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.05.008) PMID: 26026600
9. Street ME, Angelini S, Bernasconi S, Burgio E, Cassio A, Catellani C, et al. Current Knowledge on Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) from Animal Biology to Humans, from Pregnancy to Adulthood: Highlights from a National Italian Meeting. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1647. DOI: [10.3390/ijms19061647](https://doi.org/10.3390/ijms19061647) PMID: 29865233
10. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*. 1992;305(6854):609-13. DOI: [10.1136/bmj.305.6854.609](https://doi.org/10.1136/bmj.305.6854.609) PMID: 1393072
11. Guzick DS, Swan S. The decline of infertility: apparent or real? *Fertil Steril*. 2006;86(3):524-6. DOI: [10.1016/j.fertnstert.2006.05.027](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.05.027) PMID: 16952501
12. Onuzulu CD, Rotimi OA, Rotimi SO. Epigenetic modifications associated with in utero exposure to endocrine disrupting chemicals BPA, DDT and Pb. *Rev Environ Health*. 2019;34(4):309-25. DOI: [10.1515/reveh-2018-0059](https://doi.org/10.1515/reveh-2018-0059) PMID: 31271561
13. Shi Y, Qi W, Xu Q, Wang Z, Cao X, Zhou L, et al. The role of epigenetics in the reproductive toxicity of environmental endocrine disruptors. *Environ Mol Mutagen*. 2021;62(1):78-88. DOI: [10.1002/em.22414](https://doi.org/10.1002/em.22414) PMID: 33217042
14. Buck Louis G, Cooney M, Peterson C. The ovarian dysgenesis syndrome. *J Dev Orig Health Dis*. 2011;2(1):25-35. DOI: [10.1017/S2040174410000693](https://doi.org/10.1017/S2040174410000693)
15. Johansson HK, Svingen T, Fowler PA, Vinggaard AM, Boberg J. Environmental influences on ovarian dysgenesis - developmental windows sensitive to chemical exposures. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(7):400-14. DOI: [10.1038/nrendo.2017.36](https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.36) PMID: 28450750
16. Ortega-Recalde O, Goikoetxea A, Hore TA, Todd EV, Gemmell NJ. The Genetics and Epigenetics of Sex Change in Fish. *Annu Rev Anim Biosci*. 2020;8(1):47-69. DOI: [10.1146/annurev-animal-021419-083634](https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419-083634) PMID: 31525067
17. Biswas S, Ghosh S, Das S, Maitra S. Female Reproduction: At the Crossroads of Endocrine Disruptors and Epigenetics. *Proc Zool Soc*. 2021;74(4):532-45. DOI: [10.1007/s12595-021-00403-4](https://doi.org/10.1007/s12595-021-00403-4)
18. Russell S, Patel M, Gilchrist G, Stalker L, Gillis D, Rosenkranz D, et al. Bovine piRNA-like RNAs are associated with both transposable elements and mRNAs. *Reproduction*. 2017;153(3):305-18. DOI: [10.1530/REP-16-0620](https://doi.org/10.1530/REP-16-0620) PMID: 27965401
19. Kelly TL, Trasler JM. Reproductive epigenetics. *Clin Genet*. 2004;65(4):247-60. DOI: [10.1111/j.0009-9163.2004.00236.x](https://doi.org/10.1111/j.0009-9163.2004.00236.x) PMID: 15025714
20. Petkov SG, Reh WA, Anderson GB. Methylation changes in porcine primordial germ cells. *Mol Reprod Dev*. 2009;76(1):22-30. DOI: [10.1002/mrd.20926](https://doi.org/10.1002/mrd.20926) PMID: 18425774
21. Sato S, Yoshimizu T, Sato E, Matsui Y. Erasure of methylation imprinting of Igf2r during mouse primordial germ-cell development. *Mol Reprod Dev*. 2003;65(1):41-50. DOI: [10.1002/mrd.10264](https://doi.org/10.1002/mrd.10264) PMID: 12658632
22. Allegrucci C, Thurston A, Lucas E, Young L. Epigenetics and the germline. *Reproduction*. 2005;129(2):137-49. DOI: [10.1530/rep.1.00360](https://doi.org/10.1530/rep.1.00360) PMID: 15695608
23. Hiura H, Obata Y, Komiyama J, Shirai M, Kono T. Oocyte growth-dependent progression of maternal imprinting in mice. *Genes Cells*. 2006;11(4):353-61. DOI: [10.1111/j.1365-2443.2006.00943.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00943.x) PMID: 16611239
24. Pan Z, Zhang J, Li Q, Li Y, Shi F, Xie Z, et al. Current advances in epigenetic modification and alteration during mammalian ovarian folliculogenesis. *J Genet Genomics*. 2012;39(3):111-23. DOI: [10.1016/j.jgg.2012.02.004](https://doi.org/10.1016/j.jgg.2012.02.004) PMID: 22464470
25. Seki Y, Yamaji M, Yabuta Y, Sano M, Shigeta M, Matsui Y, et al. Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development*. 2007;134(14):2627-38. DOI: [10.1242/dev.005611](https://doi.org/10.1242/dev.005611) PMID: 17567665
26. Wang Z, Zang C, Cui K, Schones DE, Barski A, Peng W, et al. Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell*. 2009;138(5):1019-31. DOI: [10.1016/j.cell.2009.06.049](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.049) PMID: 19698979
27. Clough E, Moon W, Wang S, Smith K, Hazelrigg T. Histone methylation is required for oogenesis in *Drosophila*. *Development*. 2007;134(1):157-65. DOI: [10.1242/dev.02698](https://doi.org/10.1242/dev.02698) PMID: 17164421
28. Khan AU, Krishnamurthy S. Histone modifications as key regulators of transcription. *Front Biosci*. 2005;10(1-3):866-72. DOI: [10.2741/1580](https://doi.org/10.2741/1580) PMID: 15569624
29. Gu L, Wang Q, Wang CM, Hong Y, Sun SG, Yang SY, et al. Distribution and expression of phosphorylated histone H3 during porcine oocyte maturation. *Mol Reprod Dev*. 2008;75(1):143-9. DOI: [10.1002/mrd.20706](https://doi.org/10.1002/mrd.20706) PMID: 17342732
30. Swales AK, Spears N. Genomic imprinting and reproduction. *Reproduction*. 2005;130(4):389-99. DOI: [10.1530/rep.1.00395](https://doi.org/10.1530/rep.1.00395) PMID: 16183857
31. LaVoie HA. Epigenetic control of ovarian function: the emerging role of histone modifications. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;243(1-2):12-8. DOI: [10.1016/j.mce.2005.09.005](https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.09.005) PMID: 16219412
32. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001;293(5532):1074-80. DOI: [10.1126/science.1063127](https://doi.org/10.1126/science.1063127) PMID: 11498575
33. Hayashi K, Chuva de Sousa Lopes SM, Kaneda M, Tang F, Hajkova P, Lao K, et al. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS One*. 2008;3(3). DOI: [10.1371/journal.pone.0001738](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001738) PMID: 18320056
34. Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, et al. Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature*. 2008;453(7194):534-8. DOI: [10.1038/nature06904](https://doi.org/10.1038/nature06904) PMID: 18404147
35. Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, et al. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*. 2008;453(7194):539-43. DOI: [10.1038/nature06908](https://doi.org/10.1038/nature06908) PMID: 18404146
36. Tang LS, Wang Q, Xiong B, Hou Y, Zhang YZ, Sun QY, et al. Dynamic changes in histone acetylation during sheep oocyte maturation. *J Reprod Dev*. 2007;53(3):555-61. DOI: [10.1262/jrd.18130](https://doi.org/10.1262/jrd.18130) PMID: 17272922
37. Zhao H, Rajkovic A. MicroRNAs and mammalian ovarian development. *Semin Reprod Med*. 2008;26(6):461-8. DOI: [10.1055/s-0028-1096126](https://doi.org/10.1055/s-0028-1096126) PMID: 18951328
38. Fiedler SD, Carletti MZ, Hong X, Christenson LK. Hormonal regulation of MicroRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells. *Biol Reprod*. 2008;79(6):1030-7. DOI: [10.1095/biolreprod.108.069690](https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069690) PMID: 18716288
39. Koerner MV, Pauler FM, Huang R, Barlow DP. The function of non-coding RNAs in genomic imprinting. *Development*. 2009;136(11):1771-83. DOI: [10.1242/dev.030403](https://doi.org/10.1242/dev.030403) PMID: 19429783
40. Schneider S, Kaufmann W, Buesen R, van Ravenzwaay B. Vinclozolin—the lack of a transgenerational effect after oral maternal exposure during organogenesis. *Reprod Toxicol*. 2008;25(3):352-60. DOI: [10.1016/j.reprotox.2008.04.001](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.04.001) PMID: 18485663
41. Inawaka K, Kawabe M, Takahashi S, Doi Y, Tomigahara Y, Tarui H, et al. Maternal exposure to anti-androgenic compounds, vinclozolin, flutamide and procymidone, has no effects on spermatogenesis and DNA methylation in male rats of subsequent generations. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;237(2):178-87. DOI: [10.1016/j.taap.2009.03.004](https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.004) PMID: 19303894

42. Schneider S, Marxfeld H, Gröters S, Buesen R, van Ravenzwaay B. Vinclozolin—no transgenerational inheritance of anti-androgenic effects after maternal exposure during organogenesis via the intraperitoneal route. *Reprod Toxicol*. 2013;37:6-14. DOI: [10.1016/j.reprotox.2012.12.003](#) PMID: [23313085](#)
43. Zama AM, Uzumcu M. Fetal and neonatal exposure to the endocrine disruptor methoxychlor causes epigenetic alterations in adult ovarian genes. *Endocrinology*. 2009;150(10):4681-91. DOI: [10.1210/en.2009-0499](#) PMID: [19589859](#)
44. Jefferson WN, Couse JF, Padilla-Banks E, Korach KS, Newbold RR. Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER)α expression and multi-oocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERβ-mediated and nonestrogenic actions. *Biol Reprod*. 2002;67(4):1285-96. DOI: [10.1095/biolreprod.67.4.1285](#) PMID: [12297547](#)
45. Jefferson W, Newbold R, Padilla-Banks E, Pepling M. Neonatal genistein treatment alters ovarian differentiation in the mouse: inhibition of oocyte nest breakdown and increased oocyte survival. *Biol Reprod*. 2006;74(1):161-8. DOI: [10.1095/biolreprod.105.045724](#) PMID: [16192398](#)
46. Armenti AE, Zama AM, Passantino L, Uzumcu M. Developmental methoxychlor exposure affects multiple reproductive parameters and ovarian folliculogenesis and gene expression in adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;233(2):286-96. DOI: [10.1016/j.taap.2008.09.010](#) PMID: [18848953](#)
47. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor-α mediates the detrimental effects of neonatal diethylstilbestrol (DES) exposure in the murine reproductive tract. *Toxicology*. 2004;205(1-2):55-63. DOI: [10.1016/j.tox.2004.06.046](#) PMID: [15458790](#)
48. Kirigaya A, Kim H, Hayashi S, Chambon P, Watanabe H, Lguchi T, et al. Involvement of estrogen receptor β in the induction of polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Zool Sci*. 2009;26(10):704-12. DOI: [10.2108/zsj.26.704](#) PMID: [19832683](#)
49. Zama AM, Uzumcu M. Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on female reproduction: an ovarian perspective. *Front Neuroendocrinol*. 2010;31(4):420-39. DOI: [10.1016/j.jyfrne.2010.06.003](#) PMID: [20609371](#)
50. Yoon K, Kwack SJ, Kim HS, Lee BM. Estrogenic endocrine-disrupting chemicals: molecular mechanisms of actions on putative human diseases. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2014;17(3):127-74. DOI: [10.1080/10937404.2014.882194](#) PMID: [24749480](#)
51. Orphanides G, Reinberg D. A unified theory of gene expression. *Cell*. 2002;108(4):439-51. DOI: [10.1016/S0092-8674\(02\)00655-4](#) PMID: [11909516](#)
52. Li S, Hursting SD, Davis BJ, McLachlan JA, Barrett JC. Environmental exposure, DNA methylation, and gene regulation: lessons from diethylstilbestrol-induced cancers. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;983(1):161-9. DOI: [10.1111/j.1749-6632.2003.tb05971.x](#) PMID: [12724221](#)
53. Hall JM, Korach KS. Endocrine disrupting chemicals promote the growth of ovarian cancer cells via the ER-CXCL12-CXCR4 signaling axis. *Mol Carcinog*. 2013;52(9):715-25. DOI: [10.1002/mc.21913](#) PMID: [22549810](#)
54. Knowler KC, To SQ, Leung YK, Ho SM, Clyne CD. Endocrine disruption of the epigenome: a breast cancer link. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(2):T33-55. DOI: [10.1530/ERC-13-0513](#) PMID: [24532474](#)
55. Kortenkamp A. Are cadmium and other heavy metal compounds acting as endocrine disruptors? *Met Ions Life Sci*. 2011;8:305-17. PMID: [21473385](#)
56. Samtani R, Sharma N, Garg D. Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals and Epigenetic Modifications in Ovarian Cancer: A Review. *Reprod Sci*. 2018;25(1):7-18. DOI: [10.1177/1933719117711261](#) PMID: [28602118](#)
57. Romagnolo DF, Daniels KD, Grunwald JT, Ramos SA, Propper CR, Selmin OI. Epigenetics of breast cancer: modifying role of environmental and bioactive food compounds. *Mol Nutr Food Res*. 2016;60(6):1310-29. DOI: [10.1002/mnfr.201501063](#) PMID: [27144894](#)
58. Ahluwalia A, Hurteau JA, Bigsby RM, Nephew KP. DNA methylation in ovarian cancer. II. Expression of DNA methyltransferases in ovarian cancer cell lines and normal ovarian epithelial cells. *Gynecol Oncol*. 2001;82(2):299-304. DOI: [10.1006/gyno.2001.6284](#) PMID: [11531283](#)
59. Jamil Z, Fatima SS, Ahmed K, Malik R. Anti-Mullerian Hormone: Above and Beyond Conventional Ovarian Reserve Markers. *Dis Markers*. 2016;2016. DOI: [10.1155/2016/5246217](#) PMID: [26977116](#)
60. Santangeli S, Consales C, Pacchierotti F, Habibi HR, Carnevali O. Transgenerational effects of BPA on female reproduction. *Sci Total Environ*. 2019;685:1294-305. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2019.06.029](#) PMID: [31272786](#)
61. Laing LV, Viana J, Dempster EL, Trznadel M, Trunkfield LA, Uren Webster TM, et al. Bisphenol A causes reproductive toxicity, decreases dnmt1 transcription, and reduces global DNA methylation in breeding zebrafish (*Danio rerio*). *Epigenetics*. 2016;11(7):526-38. DOI: [10.1080/15592294.2016.1182272](#) PMID: [27120497](#)
62. Santangeli S, Maradonna F, Gioacchini G, Cobellis G, Piccinetti CC, Dalla Valle L, et al. BPA-Induced Deregulation Of Epigenetic Patterns: Effects On Female Zebrafish Reproduction. *Sci Rep*. 2016;6(1):21982. DOI: [10.1038/srep21982](#) PMID: [26911650](#)
63. Santangeli S, Maradonna F, Olivetto I, Piccinetti CC, Gioacchini G, Carnevali O. Effects of BPA on female reproductive function: the involvement of epigenetic mechanism. *Gen Comp Endocrinol*. 2017;245:122-6. DOI: [10.1016/j.ygcen.2016.08.010](#) PMID: [27591071](#)
64. Lite C, Ahmed SS, Santosh W, Seetharaman B. Prenatal exposure to bisphenol-A altered miRNA-224 and protein expression of aromatase in ovarian granulosa cells concomitant with elevated serum estradiol levels in F1 adult offspring. *J Biochem Mol Toxicol*. 2019;33(6). DOI: [10.1002/jbt.22317](#) PMID: [30817060](#)
65. Sabry R, Saleh AC, Stalker L, LaMarre J, Favetta LA. Effects of bisphenol A and bisphenol S on microRNA expression during bovine (*Bos taurus*) oocyte maturation and early embryo development. *Reprod Toxicol*. 2021;99:96-108. DOI: [10.1016/j.reprotox.2020.12.001](#) PMID: [33285269](#)
66. Veiga-Lopez A, Luense LJ, Christenson LK, Padmanabhan V. Developmental programming: gestational bisphenol-A treatment alters trajectory of fetal ovarian gene expression. *Endocrinology*. 2013;154(5):1873-84. DOI: [10.1210/en.2012-2129](#) PMID: [23525218](#)
67. Sabry R, Yamate J, Favetta L, LaMarre J. MicroRNAs: potential targets and agents of endocrine disruption in female reproduction. *J Toxicol Pathol*. 2019;32(4):213-21. DOI: [10.1293/tox.2019-0054](#) PMID: [31719748](#)
68. Zhang X, Ji M, Tan X, Yu K, Xu L, Chen G, et al. Role of epigenetic regulation of Igf2 and H19 in 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced ovarian toxicity in offspring rats. *Toxicol Lett*. 2019;311:98-104. DOI: [10.1016/j.toxlet.2019.04.034](#) PMID: [31063829](#)
69. Wu Q, Ohsako S, Ishimura R, Suzuki JS, Tohyama C. Exposure of mouse preimplantation embryos to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the methylation status of imprinted genes H19 and Igf2. *Biol Reprod*. 2004;70(6):1790-7. DOI: [10.1095/biolreprod.103.025387](#) PMID: [14960483](#)
70. Li L, Zhang T, Qin XS, Ge W, Ma HG, Sun LL, et al. Exposure to diethylhexyl phthalate (DEHP) results in a heritable modification of imprint genes DNA methylation in mouse oocytes. *Mol Biol Rep*. 2014;41(3):1227-35. DOI: [10.1007/s11033-013-2967-7](#) PMID: [24390239](#)
71. Rattan S, Brehm E, Gao L, Niermann S, Flaws JA. Prenatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate disrupts ovarian function in a transgenerational manner in female mice. *Biol Reprod*. 2018;98(1):130-45. DOI: [10.1093/biolre/iox154](#) PMID: [29165555](#)
72. Kawano M, Qin XY, Yoshida M, Fukuda T, Nansai H, Hayashi Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates di-(2-ethylhexyl) phthalate transgenerational repression of ovarian Esr1 expression in female mice. *Toxicol Lett*. 2014;228(3):235-40. DOI: [10.1016/j.toxlet.2014.04.019](#) PMID: [24811840](#)
73. Xu C, Chen JA, Qiu Z, Zhao Q, Luo J, Yang L, et al. 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*. 2010;199(3):323-32. DOI: [10.1016/j.toxlet.2010.09.015](#) PMID: [20920559](#)

74. Nilsson E, Larsen G, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C, Savenkova MI, Skinner MK. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of ovarian disease. *PLoS One*. 2012;7(5). DOI: [10.1371/journal.pone.0036129](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036129) PMID: 22570695
75. Nilsson E, Klukovich R, Sadler-Riggleman I, Beck D, Xie Y, Yan W, et al. Environmental toxicant induced epigenetic transgenerational inheritance of ovarian pathology and granulosa cell epigenome and transcriptome alterations: ancestral origins of polycystic ovarian syndrome and primary ovarian insufficiency. *Epigenetics*. 2018;13(8):875-95. DOI: [10.1080/15592294.2018.1521223](https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1521223) PMID: 30207508
76. Jefferson WN, Chevalier DM, Phelps JY, Cantor AM, Padilla-Banks E, Newbold RR, et al. Persistently altered epigenetic marks in the mouse uterus after neonatal estrogen exposure. *Mol Endocrinol*. 2013;27(10):1666-77. DOI: [10.1210/me.2013-1211](https://doi.org/10.1210/me.2013-1211) PMID: 24002655
77. Legoff L, Dali O, D'Cruz SC, Suglia A, Gely-Pernot A, Hémerly C, et al. Ovarian dysfunction following prenatal exposure to an insecticide, chlordecone, associates with altered epigenetic features. *Epigenetics Chromatin*. 2019;12(1):29. DOI: [10.1186/s13072-019-0276-7](https://doi.org/10.1186/s13072-019-0276-7) PMID: 31084621
78. Christensen BC, Marsit CJ. Epigenomics in environmental health. *Front Genet*. 2011(1):84. DOI: [10.3389/fgene.2011.00084](https://doi.org/10.3389/fgene.2011.00084) PMID: 22303378
79. Grindler NM, Vanderlinden L, Karthikraj R, Kannan K, Teal S, Polotsky AJ, et al. Exposure to Phthalate, an Endocrine Disrupting Chemical, Alters the First Trimester Placental Methylome and Transcriptome in Women. *Sci Rep*. 2018;8(1):6086. DOI: [10.1038/s41598-018-24505-w](https://doi.org/10.1038/s41598-018-24505-w) PMID: 29666409
80. LaRocca J, Binder AM, McElrath TF, Michels KB. The impact of first trimester phthalate and phenol exposure on IGF2/H19 genomic imprinting and birth outcomes. *Environ Res*. 2014;133:396-406. DOI: [10.1016/j.envres.2014.04.032](https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.04.032) PMID: 24972507
81. Huen K, Calafat AM, Bradman A, Yousefi P, Eskenazi B, Holland N. Maternal phthalate exposure during pregnancy is associated with DNA methylation of LINE-1 and Alu repetitive elements in Mexican-American children. *Environ Res*. 2016;148:55-62. DOI: [10.1016/j.envres.2016.03.025](https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.03.025) PMID: 27019040
82. Montrose L, Padmanabhan V, Goodrich JM, Domino SE, Treadwell MC, Meeker JD, et al. Maternal levels of endocrine disrupting chemicals in the first trimester of pregnancy are associated with infant cord blood DNA methylation. *Epigenetics*. 2018;13(3):301-9. DOI: [10.1080/15592294.2018.1448680](https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1448680) PMID: 29513082
83. Tindula G, Murphy SK, Grenier C, Huang Z, Huen K, Escudero-Fung M, et al. DNA methylation of imprinted genes in Mexican-American newborn children with prenatal phthalate exposure. *Epigenomics*. 2018;10(7):1011-26. DOI: [10.2217/epi-2017-0178](https://doi.org/10.2217/epi-2017-0178) PMID: 29957030
84. Solomon O, Yousefi P, Huen K, Gunier RB, Escudero-Fung M, Barcellos LF, et al. Prenatal phthalate exposure and altered patterns of DNA methylation in cord blood. *Environ Mol Mutagen*. 2017;58(6):398-410. DOI: [10.1002/em.22095](https://doi.org/10.1002/em.22095) PMID: 28556291
85. Miura R, Ikeda-Araki A, Ishihara T, Miyake K, Miyashita C, Nakajima T, et al. Effect of prenatal exposure to phthalates on epigenome-wide DNA methylations in cord blood and implications for fetal growth: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Sci Total Environ*. 2021;783. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2021.147035](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147035) PMID: 33872906
86. Chen CH, Jiang SS, Chang IS, Wen HJ, Sun CW, Wang SL. Association between fetal exposure to phthalate endocrine disruptor and genome-wide DNA methylation at birth. *Environ Res*. 2018;162:261-70. DOI: [10.1016/j.envres.2018.01.009](https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.01.009) PMID: 29367177
87. Ding T, Yan W, Zhou T, Shen W, Wang T, Li M, et al. Endocrine disrupting chemicals impact on ovarian aging: evidence from epidemiological and experimental evidence. *Environ Pollut*. 2022;305. DOI: [10.1016/j.envpol.2022.119269](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119269) PMID: 35405219
88. Özel Ş, Tokmak A, Aykut O, Aktulay A, Hancıoğlu N, Engin Ustun Y. Serum levels of phthalates and bisphenol-A in patients with primary ovarian insufficiency. *Gynecol Endocrinol*. 2019;35(4):364-7. DOI: [10.1080/09513590.2018.1534951](https://doi.org/10.1080/09513590.2018.1534951) PMID: 30638094
89. Ziv-Gal A, Flaws JA. Evidence for bisphenol A-induced female infertility: a review (2007-2016). *Fertil Steril*. 2016;106(4):827-56. DOI: [10.1016/j.fertnstert.2016.06.027](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.06.027) PMID: 27417731
90. Fang H, Tong W, Perkins R, Soto AM, Precht NV, Sheehan DM. Quantitative comparisons of in vitro assays for estrogenic activities. *Environ Health Perspect*. 2000;108(8):723-9. DOI: [10.1289/ehp.00108723](https://doi.org/10.1289/ehp.00108723) PMID: 10964792
91. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Soriano S, García-Arévalo M, Ripoll C, Fuentes E, et al. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;355(2):201-7. DOI: [10.1016/j.mce.2011.12.012](https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.12.012) PMID: 22227557
92. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquié M, Gauthier BR, et al. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One*. 2008;3(4). DOI: [10.1371/journal.pone.0002069](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002069) PMID: 18446233
93. Kortenkamp A. Low dose mixture effects of endocrine disruptors: implications for risk assessment and epidemiology. *Int J Androl*. 2008;31(2):233-40. DOI: [10.1111/j.1365-2605.2007.00862.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00862.x) PMID: 18248400
94. Skledar DG, Mašič LP. In vitro estrogenic activity of binary and multicomponent mixtures with bisphenol A. *Sci Total Environ*. 2020;707. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2019.135211](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135211) PMID: 31869609
95. Thrupp TJ, Runnalls TJ, Scholze M, Kugathas S, Kortenkamp A, Sumpter JP. The consequences of exposure to mixtures of chemicals: something from 'nothing' and 'a lot from a little' when fish are exposed to steroid hormones. *Sci Total Environ*. 2018;619-620:1482-92. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2017.11.081](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.081) PMID: 29734624
96. Durcik M, Grobin A, Rožkar R, Trontelj J, Peterlin Mašič L. Estrogenic potency of endocrine disrupting chemicals and their mixtures detected in environmental waters and wastewaters. *Chemosphere*. 2023;330. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2023.138712](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138712) PMID: 37068617
97. Manikkam M, Guerrero-Bosagna C, Tracey R, Haque MM, Skinner MK. Transgenerational actions of environmental compounds on reproductive disease and identification of epigenetic biomarkers of ancestral exposures. *PLoS One*. 2012;7(2). DOI: [10.1371/journal.pone.0031901](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031901) PMID: 22389676
98. Trasande L, Zoeller RT, Hass U, Kortenkamp A, Grandjean P, Myers JP, et al. Burden of disease and costs of exposure to endocrine disrupting chemicals in the European Union: an updated analysis. *Andrology*. 2016;4(4):565-72. DOI: [10.1111/andr.12178](https://doi.org/10.1111/andr.12178) PMID: 27003928
99. Patkin EL, Grudinina NA, Sasina LK, Noniashvili EM, Pavlinova LI, Suchkova IO, et al. Asymmetric DNA methylation between sister chromatids of metaphase chromosomes in mouse embryos upon bisphenol A action. *Reprod Toxicol*. 2017;74:1-9. DOI: [10.1016/j.reprotox.2017.08.017](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.08.017) PMID: 28843703
100. Susiarjo M, Sasson I, Mesaros C, Bartolomei MS. Bisphenol A exposure disrupts genomic imprinting in the mouse. *PLoS Genet*. 2013;9(4). DOI: [10.1371/journal.pgen.1003401](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003401) PMID: 23593014
101. Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(32):13056-61. DOI: [10.1073/pnas.0703739104](https://doi.org/10.1073/pnas.0703739104) PMID: 17670942
102. Chao HH, Zhang XF, Chen B, Pan B, Zhang LJ, Li L, et al. Bisphenol A exposure modifies methylation of imprinted genes in mouse oocytes via the estrogen receptor signaling pathway. *Histochem Cell Biol*. 2012;137(2):249-59. DOI: [10.1007/s00418-011-0894-z](https://doi.org/10.1007/s00418-011-0894-z) PMID: 22131059
103. Liu Y, Zhang Y, Tao S, Guan Y, Zhang T, Wang Z. Global DNA methylation in gonads of adult zebrafish *Danio rerio* under bisphenol A exposure. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2016;130:124-32. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2016.04.012](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.04.012) PMID: 27101439
104. Zhang XF, Zhang LJ, Feng YN, Chen B, Feng YM, Liang GJ, et al. Bisphenol A exposure modifies DNA methylation of imprint genes in mouse fetal germ cells. *Mol Biol Rep*. 2012;39(9):8621-8. DOI: [10.1007/s11033-012-1716-7](https://doi.org/10.1007/s11033-012-1716-7) PMID: 22699882
105. Brehm E, Rattan S, Gao L, Flaws JA. Prenatal Exposure to Di(2-Ethylhexyl) Phthalate Causes Long-Term Transgenerational Effects on Female Reproduction in Mice. *Endocrinology*. 2018;159(2):795-809. DOI: [10.1210/en.2017-03004](https://doi.org/10.1210/en.2017-03004) PMID: 29228129