



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΠΠΤΩΣΕΙΣ ΠΡΩΙΜΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΘΗΛΥΚΩΝ ΜΥΩΝ
ΣΕ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΥΣ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ ΣΤΟ
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΥ ΛΥΔΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

**ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΠΡΩΙΜΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΘΗΛΥΚΩΝ ΜΥΩΝ
ΣΕ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΥΣ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ ΣΤΟ
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΥ ΛΥΔΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΣΤΑΜΑΤΑΚΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ – ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ
ΣΤΑΜΑΤΑΚΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ – ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΓΑΪΤΑΝΑΚΗ – ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΕΥΘΥΜΙΑ ΚΙΤΡΑΚΗ – ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1 ΤΟ ΘΗΛΥΚΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	5
1.1.1 Η ωοθήκη	5
1.1.2 Δημιουργία της αρχέγονης γονάδας στον ποντικό	6
1.2 ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ	7
1.2.1 Το αρχέγονο ωοθυλάκιο	7
1.2.2 Το πρωτογενές ωοθυλάκιο	8
1.2.3 Το δευτερογενές/προ-κοιλωματικό ωοθυλάκιο	8
1.2.4 Το κοιλωματικό ωοθυλάκιο	9
1.2.5 Η ωορρηξία	10
1.2.6 Το ωχρο σωματίο	10
1.3 ΑΤΡΗΣΙΑ	11
1.3.1 Παράγοντες κυτταρικής επιβίωσης στην ωοθήκη	11
1.3.2 Παράγοντες κυτταρικού θανάτου στην ωοθήκη	12
1.3.3 Ατρησία στα διάφορα στάδια ωοθηκικής ανάπτυξης	13
1.3.4 Ο ρόλος της ωοθυλακικής ατρησίας	14
1.4 ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ	14
1.5 FSH – LH	17
1.5.1 Ο ρόλος των γοναδοτροπινών	17
1.5.2 Ρύθμιση γοναδοτροπινών	18
1.6 FSHR	19
1.6.1 Απενεργοποίηση του <i>Fshr</i>	19
1.6.2 Συνεχής ενεργοποίηση του <i>Fshr</i>	19
1.7 ΟΙΣΤΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ	20
1.8 ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ	22
1.8.1 Μηχανισμοί δράσης ενδοκρινικών διαταρακτών	24
1.9 ΦΘΑΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	27
1.10 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΣΤΗΝ ΩΟΘΗΚΗ	28

1.10.1 Μελέτες μεμονωμένων φθαλικών εστέρων σε πειραματόζωα	28
1.10.2 Μελέτες μειγμάτων φθαλικών εστέρων σε πειραματόζωα	34
1.10.3 Επιδημιολογικές μελέτες στον άνθρωπο	35
2. ΣΚΟΠΟΣ	37
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	38
3.1 Πειραματόζωα	38
3.2 Σύσταση μίγματος (S) φθαλικών εστέρων	38
3.3 Αναπαραγωγή και έκθεση στο μίγμα των φθαλικών	38
3.4 Μέτρηση βάρους σώματος	39
3.5 Πρωκτογεννητική απόσταση (Anogenital Distance, AGD)	39
3.6 Έλεγχος εισόδου των θηλυκών ποντικών στη εφηβεία	39
3.7 Θυσίες των πειραματοζώων	40
3.8 Προσδιορισμός της φάσης του οιστρικού κύκλου	40
3.9 Μονιμοποίηση ιστών	40
3.10 Μορφομετρία των ωοθηκών	41
3.11 Απομόνωση RNA	42
3.12 qRT – PCR	42
3.13 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	44
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
4.1 Βάρος σώματος	45
4.2 Πρωκτογεννητική απόσταση (AGD)	46
4.3 Λόγος AGD / βάρος σώματος	47
4.4 Βάρος ωοθηκών	48
4.5 Λόγος βάρους ωοθήκης / βάρος σώματος	49
4.6 Ηλικία εισόδου στην εφηβεία – ημέρα διάνοιξης κόλπου (vaginal opening)	50
4.7 Μορφολογία ωοθήκης – στην ηλικία των 21 ημερών	51
4.8 Μορφολογία ωοθήκης – στην ηλικία των 90 ημερών	55
4.9 Επίπεδα mRNA του υποδοχέα FSH (FSHR) στην ωοθήκη	59
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	66
7. ABSTRACT	68
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες είναι εξωγενείς χημικές ενώσεις που μπορούν να εισέλθουν στον οργανισμό και να παρέμβουν στη φυσιολογική λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος. Στους ενδοκρινικούς διαταράκτες ανήκουν, μεταξύ άλλων, οι φθαλικές ενώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως για την κατασκευή πλαστικών και καλλυντικών προϊόντων. Πολυάριθμες μελέτες των τελευταίων δεκαετιών, έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη των χημικών αυτών ενώσεων και υποδεικνύουν την εμπλοκή τους τόσο στην ανάπτυξη, όσο και στην αναπαραγωγική υγεία των οργανισμών. Οι μελέτες αυτές επιβεβαιώνουν ότι οι φθαλικές ενώσεις μπορούν να εισέλθουν ακόμη και στο προστατευμένο περιβάλλον της μήτρας και να παρέμβουν στη φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη, θέτοντας τις βάσεις για την εκδήλωση ποικίλων δυσλειτουργιών και ασθενειών καθόλη την υπόλοιπη διάρκεια της ζωής. Μελετώντας, λοιπόν, τις επιδράσεις των φθαλικών ενώσεων στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα μετά από ενδομήτρια έκθεση, μπορούμε να ελέγξουμε την ασφάλεια των ενώσεων που χρησιμοποιούμε ολοένα και περισσότερο στην καθημερινότητά μας, να εντοπίσουμε τα αίτια εμφάνισης διαφόρων παθολογιών και να στοχεύσουμε στη δημιουργία ενός ασφαλέστερου περιβάλλοντος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας, η οποία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βασικών Ιατροβιολογικών Επιστημών του Τμήματος Οδοντιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που συνέβαλαν στη διεκπεραίωσή της.

Κατά κύριο λόγο, οφείλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα της πτυχιακής μου εργασίας, Αναπληρωτή Καθηγητή κύριο Αντώνη Σταματάκη, για την εμπιστοσύνη που μου έχει δείξει όλα αυτά τα χρόνια, τις ευκαιρίες που μου έχει δώσει να παρουσιάσω τη δουλειά μου στο εξωτερικό και να συνεργαστώ με πολύ αξιόλογα πρόσωπα του ερευνητικού χώρου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια καθηγήτρια κυρία Ευθυμία Κιτράκη, για την ευκαιρία να δουλέψω στο εργαστήριό της, αλλά και τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Καθηγήτρια κυρία Αικατερίνη Γαϊτάνάκη, μέλος της τριμελούς επιτροπής μου, για το ενδιαφέρον που προκάλεσε σε μένα και πολλούς ακόμη φοιτητές του τμήματος Βιολογίας με τις διαλέξεις της και τη μετάδοση του αντικειμένου της.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, τις μεταπτυχιακούς Μαργαρίτα Γκατζογιάννη, Ειρήνη Χατζοπούλου, Έμιλυ Παναγιωτίδου, καθώς και τη μεταδιδάκτωρ Νατάσα Ρεπούσκου για την απρόσκοπτη υποστήριξη και καθοδήγησή τους τόσο σε επιστημονικό όσο και προσωπικό επίπεδο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και όλους τους φίλους μου, τη δεύτερη οικογένειά μου, που ήταν δίπλα μου σε όλα τα όμορφα και τα δύσκολα. Δε θα μπορούσα να έχω φτάσει εδώ που βρίσκομαι σήμερα χωρίς την ψυχολογική υποστήριξη και το κουράγιο που μου έδιναν ανιδιοτελώς σε κάθε μου βήμα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

FSH	Follicle Stimulating Hormone
LH	Luteinizing hormone
FGSCs	Female Germline Stem Cells
dpc	Day Post Coital
FOXL2	Forkhead box protein L2
WNT4	Wingless – Type MMTV integration site family, member 4
Sry	Sex determining region Y
Sox9	SRY box 9
POF	Premature Ovarian Failure
BMP	Bone Morphogenetic Protein
GDF9	Growth Differentiation Factor 9
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
IL-1 β	Interleukin 1 β
EGF	Epidermal Growth Factor
TGF- α	Transforming Growth Factor α
FGF	Fibroblast Growth Factor
GH	Growth Hormone
Bcl-2	B – cell lymphoma 2
NO	Nitric Oxide
E2	Estradiol
LHCGR	Lutenizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor
FSHR	Follicle Stimulating Hormone Receptor
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory protein
CYP11A1	Cytochrome P450 11A1
HSD3B	Hydroxy – Delta – 5 – Steroid Dehydrogenase 3B
DHEA	Dehydroepiandrosterone
CYP17A1	Cytochrome P450 17A1
HSD17B	Hydroxy – Delta – 5 – Steroid Dehydrogenase 17B
CYP19A1	Cytochrome P450 19A1
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GPCRs	G – Protein Coupled Receptors
KO	Knock out
VO	Vaginal Opening
AGD	Anogenital Distance
EDC	Endocrine Disrupting Chemical
PCBs	Polychlorinated Biphenyls
BPA	Bisphenol
DES	Diethylstilbestrol
DDT	p,p' – Dichloro – Diphenyl – Trichloroethane
PCOS	Polycystic Ovary Syndrome
EE2	Ethinylestradiol
ER	Estrogen Receptor
AR	Androgen Receptor
hCG	Human Chorionic Gonadotropin
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level

NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
DOHaD	Developmental Origins of Health and Disease
DINP	Diisononyl Phthalate
DIDP	Diisodecyl Phthalate
DEHP	Di-2-Ethylhexyl Phthalate
DBP	Dibutyl Phthalate
BBzP	Benzylbutyl Phthalate
MEHP	Monoethylhexyl Phthalate
PND	Postnatal Day
ROS	Reactive Oxygen Species
MBP	Mono-Butyl Phthalate
PVC	Polyvinyl Chloride
DEP	Diethyl Phthalate
DIBP	Diisobutyl Phthalate
MBzP	Mono-benzyl Phthalate
MINP	Monoisononyl Phthalate
DMSO	Dimethylsulfoxide
PFA	Paraformaldehyde
CTs	Cycle Threshold
ANOVA	Analysis of Variance
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SEM	Standard Error of Means
POFs	Polyovular Follicles

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΤΟ ΘΗΛΥΚΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα των θηλαστικών αποτελείται από τις ωοθήκες, τον ωαγωγό, τη μήτρα, τον κόλπο και τα εξωτερικά γεννητικά όργανα. Οι ωοθήκες αποτελούν ένα από τα βασικότερα όργανα του συστήματος αυτού, δεδομένου ότι είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία των γαμετών, τη σύνθεση και έκκριση στεροειδών ορμονών και κατ'επέκταση, τη ρύθμιση της ανάπτυξης των γεννητικών οργάνων και των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου, κατά τη διάρκεια της ζωής.

Με την είσοδο στην εφηβεία, το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα υφίσταται περιοδικές αλλαγές που οδηγούν στην ωορρηξία, με στόχο μία πιθανή εγκυμοσύνη. Οι περιοδικές αλλαγές έχουν διαφορετική διάρκεια ανάλογα με τον οργανισμό στον οποίο παρατηρούνται. Στον άνθρωπο, για παράδειγμα, ένας τέτοιος κύκλος αλλαγών ονομάζεται «έμμηνος/εμμηνορρυσιακός κύκλος» και διαρκεί περίπου 28 ημέρες, ενώ στον ποντικό η ονομασία που χρησιμοποιείται ευρέως είναι «οιστρικός κύκλος» και διαρκεί συνήθως 4 – 6 ημέρες.

Ο ωοθητικός κύκλος, όπως ονομάζεται και στις δύο περιπτώσεις, ελέγχεται από τον υποθάλαμο που επάγει την έκκριση των γοναδοτροπινών της υπόφυσης (FSH, LH), οι οποίες προκαλούν τις κυκλικές μεταβολές στις ωοθήκες και τελικά στο υπόλοιπο αναπαραγωγικό σύστημα.

1.1.1 Η ωοθήκη

Η ωοθήκη περικλείεται από ένα επιθήλιο μέσα στο οποίο συναντώνται δύο διακριτές περιοχές: ο φλοιός, ο οποίος βρίσκεται εξωτερικά και περιλαμβάνει τα ωοθυλάκια, τα ωχρά σωμάτια και τα στρωματικά κύτταρα και ο μυελός, στον οποίο συναντάται το αγγειακό δίκτυο, λεμφαγγεία και νευρικά κύτταρα και βρίσκεται εσωτερικά (Hannon and Flaws, 2015).

Μία από τις βασικές διαφορές μεταξύ θηλυκού και αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος, είναι ότι ενώ στα αρσενικά η παραγωγή των γαμετικών κυττάρων στον όρχι γίνεται συνεχώς, τα θηλυκά γεννιούνται με πεπερασμένο αριθμό ωοθυλακίων που θα αποτελέσουν τη δεξαμενή γαμετών σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους, καθορίζοντας εξ αρχής το αναπαραγωγικό δυναμικό του ατόμου (Hirshfield, 1991).

Ερχόμενες σε αντίθεση με τα παραπάνω, πρόσφατες ερευνητικές μελέτες υποδεικνύουν την ύπαρξη θηλυκών βλαστοκυττάρων γαμετικής σειράς (female germline stem cells - FGSCs), τα οποία αναπτύσσονται σε ώριμα ωοκύτταρα όταν μεταμοσχεύονται σε ωοθήκες στείρων ποντικών και οδηγούν στην απόκτηση υγιών απογόνων (Johnson et al., 2004; 2005; Zou et al., 2009). Παρόλα αυτά, πρέπει να πραγματοποιηθούν ακόμη πολλές μελέτες για να εξακριβωθεί ο φυσιολογικός ρόλος των FGSCs και ο μηχανισμός με τον οποίο χρησιμοποιούνται από την ωοθήκη.

1.1.2 Δημιουργία της αρχέγονης γονάδας στον ποντικό

Οι αρχέγονες αδιαφοροποίητες γονάδες, που αναφέρονται συνηθέστερα ως «γεννητικές ακρολοφίες» (genital ridges), αποτελούνται από δύο σειρές επιθηλιακών κυττάρων που εκτείνονται κατά μήκος της εσωτερικής επιφάνειας των μεσόνεφρων (Ungewitte and Yao, 2013). Εάν στο XY έμβρυο εκφράζεται το γονίδιο *Sry* (Sex-determining region of the Y chromosome), τότε οι γεννητικές ακρολοφίες θα δώσουν τους όρχεις, ο σχηματισμός των οποίων ξεκινά κατά την εμβρυική ημέρα (dpc) 10.5 με την εξειδίκευση της σειράς των κυττάρων Sertoli (Gubbay et al., 1990; Sinclair et al., 1990; Koopman et al., 1991). Αντιθέτως, εάν από τον οργανισμό απουσιάζει το γονίδιο *Sry*, τότε οι αρχέγονες γονάδες μετατρέπονται σε ωθήκες, η διαμόρφωση των οποίων πραγματοποιείται με πολύ πιο αργό ρυθμό από ότι συμβαίνει στους όρχεις. Στις ωθήκες, τα πρώτα σωματικά κύτταρα που διαφοροποιούνται ως απάντηση σε ενδογενή και εξωγενή μηνύματα είναι τα προ – κοκκιώδη κύτταρα, η διαφοροποίηση των οποίων ξεκινά περίπου την dpc 12.5 (Schmidt et al., 2004; Ottolenghi et al., 2007).

Η απουσία του *Sry* δεν είναι η μόνη προϋπόθεση για τη μετατροπή της αρχέγονης αδιαφοροποίητης γονάδας σε ωθήκη. Απαραίτητη είναι και η έκφραση πολλών παραγόντων όπως η β-κατενίνη, η φολλιστατίνη, το FOXL2, το WNT4, κ.ά. (Liu et al., 2010a; Ungewitte and Yao, 2013). Παρόλα αυτά, η σημασία του *Sry* για τη φυλετική διαφοροποίηση είναι αδιαμφισβήτητη κι έχειδειχθεί από μελέτες στον ποντικό, με διαγραφή του ομόλογου γονιδίου *Sry* σε XY ζώα που αποκτούν φαινότυπο θηλυκού ατόμου, αλλά και με τη δημιουργία διαγονιδιακών XX ποντικών που αναπτύσσονται ως αρσενικά, εφόσον διαθέτουν το χρωμοσωμικό τμήμα με το *Sry* (Gubbay et al., 1990; Koopman et al., 1991). Επιπλέον αποδείξεις προέρχονται και από μελέτες σε ανθρώπους, όπου XY θηλυκά άτομα εμφανίζουν μεταλλάξεις στην περιοχή του *Sry*, ενώ XX αρσενικά άτομα διαθέτουν χρωμοσωμικό DNA από το Y χρωμόσωμα (Berta et al., 1990; Jager et al., 1990).

Τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα (primordial germ cells) μεταναστεύουν στις γεννητικές ακρολοφίες κατά τις εμβρυικές ημέρες 10.5 – 11.5 και στα δύο φύλα (Ginsburg et al., 1990). Τα κύτταρα εκείνα που θα βρεθούν στις αδιαφοροποίητες γονάδες οι οποίες θα δώσουν τελικά τις ωθήκες, ονομάζονται πλέον «ωογόνια» και έχουν αυξημένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό. Μέσω συνεχών μιτώσεων, τα ωογόνια δίνουν συσσωματώματα ή «φωλιές» γαμετικών κυττάρων τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με κυτταροπλασματικές γέφυρες (Pepling and Sprandling, 1998). Την ίδια περίοδο αναπτύσσεται και ένα εκτεταμένο αγγειακό δίκτυο, όπως φαίνεται μετά από χρήση κατάλληλων μοριακών δεικτών (Bullejos et al., 2002).

Σε μετέπειτα στάδιο αρχίζουν να περιβάλλονται από πεπλατυσμένα (squamous) προ-κοκκιώδη σωματικά κύτταρα (Gondos, 1973). Στο στάδιο αυτό, γύρω στην dpc 13.5, σταματά η μιτωτική διαίρεση και ξεκινά η μείωση I μέχρι το ωοκύτταρο, όπως ονομάζεται πια, να φτάσει στο στάδιο διπλοταινίας της μειωτικής πρόφασης I (Monk and McLaren, 1981; Borum, 1961). Σε αυτό το στάδιο η μείωση σταματά και ξαναξεκινά όταν το ωοθυλάκιο φτάσει στο στάδιο της ωορρηξίας.

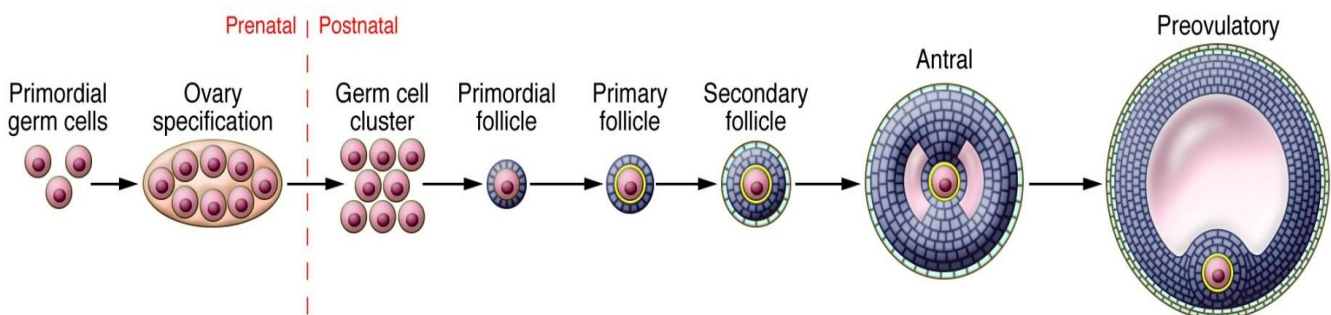
1.2 ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ

1.2.1 Το αρχέγονο ωοθυλάκιο

Στον ποντικό, κατά τη γέννηση, η ωοθήκη αποτελείται από «φωλιές» αρχέγονων γαμετικών και επιθηλιακών κυττάρων, που περιβάλλονται από μεσέγγυμα. Από την πρώτη εβδομάδα μετά τη γέννηση αρχίζουν να σχηματίζονται τα αρχέγονα ωοθυλάκια (primordial follicles), όταν προ-κοκκιώδη κύτταρα με επίμηκες σχήμα, διασπούν τις «φωλιές» αυτές και αρχίζουν να περιβάλλουν μεμονωμένα ωοκύτταρα (Baker, 1971; Hirshfield, 1991; Montano et al., 1995; Ungewitte and Yao, 2013). Η πλειοψηφία των ωοκυττάρων που δε θα συμμετέχει στο σχηματισμό των ωοθυλακίων, θα υποστεί προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο/απόπτωση.

Πολύ σημαντικό βήμα για την αρχή της δημιουργίας των ωοθυλακίων, αποτελεί η εξειδίκευση των κοκκιωδών κυττάρων. Αυτή βασίζεται κυρίως σε σηματοδότηση μέσω του μεταγραφικού παράγοντα FOXL2, που συναντάται στα προ-κοκκιώδη κύτταρα από τη 12.5 dpc (Schmidt et al., 2004; Ottolenghi et al., 2007; Pisarska et al., 2011). Ο FOXL2 είναι σημαντικός γιατί παρεμποδίζει την πρόωρη ωρίμανση των ωοθυλακίων, καταστέλλοντας γονίδια που συμμετέχουν στην τελική διαφοροποίηση των κοκκιωδών κυττάρων (Pollack et al., 1997; Baron et al., 2004) και παρεμποδίζει τη μετατροπή των κοκκιωδών κυττάρων σε κύτταρα Sertoli, συμμετέχοντας στην καταστολή του – σημαντικού για την ορχική διαφοροποίηση – γονιδίου *Sox9* (Uhlenhaut et al., 2009).

Εκτός από τα πλακώδη κοκκιώδη κύτταρα και το ωοκύτταρο, βασικό συστατικό των αρχέγονων ωοθυλακίων αποτελεί μία στιβάδα εξωκυττάριας ουσίας. Η στιβάδα αυτή ονομάζεται βασική μεμβράνη ή βασικός υμένας (basal lamina) και περιβάλλει τη στιβάδα των κοκκιωδών κυττάρων σε όλα τα στάδια ανάπτυξης. Ο ρόλος της είναι να παρέχει μηχανική υποστήριξη στο ωοθυλάκιο, να διατηρεί τη δομή του, να το διαχωρίζει από τα γύρω στρωματικά κύτταρα, καθώς και να ρυθμίζει την ανάπτυξή του. Το τελευταίο επιτυγχάνεται μέσω πρόσδεσης στους υποδοχείς της βασικής μεμβράνης, ποικίλων ορμονών και αναπτυξιακών παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη τόσο των κοκκιωδών κυττάρων όσο και του ωοκυττάρου (Rodgers et al., 2003; Irving-Rodgers and Rodgers, 2006; Octem and Oktay, 2008).



Εικόνα 1: Στάδια ωοθυλακιογένεσης (Προσαρμογή από Richards and Pangas, 2010)

Το αρχέγονο ωοθυλάκιο μπορεί στη συνέχεια να ακολουθήσει μία από τις παρακάτω πορείες:

α) Να παραμείνει σε διάπαυση: η πορεία αυτή εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες που καταστέλλουν την ενεργοποίησή του και που εάν απουσιάζουν, προκαλείται πρόωρη στρατολόγηση των αρχέγονων ωοθυλακίων και, τελικά, πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (premature ovarian failure – POF) (Castrillon et al., 2003; Rajareddy et al., 2007; Reddy et al., 2008; Adhikari et al., 2010).

β) Να ενεργοποιηθεί και να αρχίσει να αναπτύσσεται (Εικόνα 1): η στρατολόγηση ρυθμίζεται από πολλούς ενδοωοθηκικούς αυξητικούς παράγοντες που δρουν αυτοκρινώς ή παρακρινώς και καθορίζεται από την αλληλεπίδραση του ωοκυττάρου με τα κοκκιώδη κύτταρα αλλά και με εκείνα που θα δώσουν τελικά τα κύτταρα θήκης (Hirshfield, 1991; Fortune, 2003; Skinner, 2005; Oktem and Urman, 2010). Η διαδικασία αυτή δεν εξαρτάται από τις γοναδοτροπίνες (Hannon and Flaws, 2015).

γ) Να υποστεί ατρησία: είναι ένα είδος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που θα περιγραφεί εκτενέστερα στη συνέχεια.

1.2.2 Το πρωτογενές ωοθυλάκιο

Εάν το αρχέγονο ωοθυλάκιο ενεργοποιηθεί και αρχίσει να αναπτύσσεται, τότε το πρώτο βήμα είναι η μετατροπή του σε πρωτογενές ωοθυλάκιο (primary follicle). Κάποιες από τις βασικές αλλαγές που πραγματοποιούνται σε αυτήν τη φάση, είναι η αύξηση του μεγέθους του ωοκυττάρου και η εμφάνιση της διαυγούς ζώνης, μίας εξωκυττάριας ουσίας γλυκοπρωτεϊνικής φύσης που εναποτίθεται μεταξύ του ωοκυττάρου και της κοκκιώδους στιβάδας (Rankin et al., 1996; Wilhelm et al., 2007). Η πιο σημαντική αλλαγή, όμως, είναι η μετατροπή των πεπλατυσμένων κοκκιωδών κυττάρων σε κυβοειδή, τα οποία πραγματοποιούν διαφορετικές λειτουργίες. Για να γίνει αυτό, θα πρέπει να υπάρξει η απαραίτητη σηματοδότηση από το ωοκύτταρο, η οποία εκτός από τις μορφολογικές αλλαγές θα προκαλέσει και αλλαγές του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των κυττάρων με αποτέλεσμα να αρχίσουν να διαιρούνται και να αυξάνουν σε αριθμό (Lintern-Moore and Moore, 1979).

Το ποια αρχέγονα ωοθυλάκια θα ενεργοποιηθούν πρώτα, έχει υποτεθεί πως εξαρτάται από το ποια ωοκύτταρα έφτασαν πρώτα στην παύση της μείωσης I (Henderson and Edwards, 1968), ενώ το πόσα θα ενεργοποιηθούν τελικά, φαίνεται να επηρεάζεται από την ηλικία του θηλυκού ατόμου, αλλά και από το διαθέσιμο απόθεμα των ωοθυλακίων (Hage et al., 1978; Hirshfield, 1994).

1.2.3 Το δευτερογενές/προ-κοιλωματικό ωοθυλάκιο

Σε επόμενο στάδιο, τα κοκκιώδη κύτταρα πολλαπλασιάζονται και δίνουν αρχικά δύο και μετέπειτα περισσότερες στιβάδες, με αποτέλεσμα το σχηματισμό των δευτερογενών (secondary) ή προ-κοιλωματικών (preantral) ωοθυλακίων. Σε αυτό το στάδιο, άλλα σωματικά κύτταρα που βρίσκονται στην ωοθήκη διαφοροποιούνται σε κύτταρα θήκης, τα οποία αρχίζουν να δημιουργούν στιβάδες γύρω από το αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο (Hannon and Flaws, 2015).

Οι στιβάδες των κυττάρων θήκης διαμερισματοποιούνται περαιτέρω σε εξωτερική και εσωτερική θήκη. Η εξωτερική θήκη αποτελείται από ινοβλάστες, μακροφάγα, λεία μυϊκά κύτταρα και νευρικά κύτταρα τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύσπαση του ωοθυλακίου κατά την ωορρηξία και δεν ανταποκρίνονται σε ορμονικά ερεθίσματα. Η εσωτερική θήκη, αντιθέτως, αποτελείται από κύτταρα που απαντούν σε ορμονικά ερεθίσματα με τη βοήθεια κατάλληλων υποδοχέων και συμμετέχουν στη σύνθεση και έκκριση στεροειδών ορμονών (Conti and Chang, 2016; Serdar and Bulum, 2016). Ένας ακόμα σημαντικός ρόλος των κυττάρων της εσωτερικής θήκης, είναι η εγκαθίδρυση του αγγειακού συστήματος. Σε αρχικά στάδια που το ωοθυλάκιο αποτελείται από λίγα κύτταρα, δεν υπάρχει ανάγκη για την ύπαρξη αγγειακού συστήματος. Αυτό όμως αλλάζει στα επόμενα στάδια οπότε και αναπτύσσεται αγγειακό δίκτυο μεταξύ των κυττάρων θήκης. Η ύπαρξη του δικτύου αυτού είναι πολύ βασική από τη μία για να διοχετεύει απαραίτητα θρεπτικά συστατικά στα κύτταρα του ωοθυλακίου κι από την άλλη για να μεταφέρει τις στεροειδείς ορμόνες που συντίθενται από αυτά, σε όλους τους ιστούς – στόχους (Ungewitte and Yao, 2013).

1.2.4 Το κοιλωματικό ωοθυλάκιο

Στη συνέχεια, στα ωοθυλάκια που συνεχίζουν την ανάπτυξή τους, αρχίζουν να εμφανίζονται μικρές κοιλότητες γεμάτες με υγρό, οι οποίες τελικά θα ενωθούν σχηματίζοντας μία ενιαία κοιλότητα που ονομάζεται άντρο (antrum) (Hannon and Flaws, 2015). Το ωοθυλακικό υγρό εκκρίνεται από τα κοκκιώδη κύτταρα και περιλαμβάνει ό,τι και το πλάσμα του αίματος δηλαδή πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, ένζυμα, στεροειδείς ορμόνες κ.α (Rodgers and Irving-Rodgers, 2010).

Σε αυτή τη φάση, το μέγεθος των ωοκυττάρων συνεχίζει να αυξάνεται, τα κοκκιώδη κύτταρα και τα κύτταρα θήκης συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται ενώ παράλληλα επεκτείνεται και το αγγειακό δίκτυο (Oktem and Urman, 2010). Λόγω της αύξησης του μεγέθους του ωοθυλακίου και, επομένως, της δυσκολίας διάχυσης διαφόρων συστατικών μεταξύ των κυττάρων του, κάθε κύτταρο δέχεται πολύ συγκεκριμένο συνδυασμό σημάτων, ανάλογα με τη σχετική του θέση. Κάτι τέτοιο οδηγεί και σε διαφοροποίηση των κοκκιωδών κυττάρων σε τοιχωματικά (mural), που βρίσκονται στην περιφέρεια του άντρου και κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (cumulus), που περιβάλλουν το ωοκύτταρο (Knight and Glister, 2006)

Πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό των ωοθυλακίων με άντρο είναι η αυξημένη απαντητικότητά τους στις γοναδοτροπίνες της υπόφυσης, την ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη (follicle stimulating hormone ή FSH) και την ωχρινοτρόπο ορμόνη (lutening hormone ή LH) και η παραγωγή σημαντικής ποσότητας οιστρογόνων. Παρότι οι γοναδοτροπίνες φαίνεται να επηρεάζουν και προηγούμενα στάδια της ωοθυλακικής ανάπτυξης, η δράση τους δεν είναι απαραίτητη μέχρι το ωοθυλάκιο να φτάσει στη φάση εμφάνισης του άντρου. Επιπλέον, τα κύτταρα του ώριμου ωοθυλακίου διαθέτουν και υποδοχείς οιστρογόνων, ανδρογόνων, προλακτίνης και προσταγλανδινών.

1.2.5 Η ωορρηξία

Από όλα τα ωοθυλάκια που θα φτάσουν στο κοιλωματικό στάδιο, μικρός αριθμός θα συνεχίσει να αναπτύσσεται σε κάθε έμμηνο/οιστρικό κύκλο, ενώ πολλά από αυτά θα εκφυλιστούν. Διαφορετική έκθεση σε αυξητικούς παράγοντες, καθιστά κάποια ωοθυλάκια πιο ευαίσθητα στα αντι-αποπτωτικά σήματα της FSH, με αποτέλεσμα η ανάπτυξή τους να προχωρά μέχρι και το τελικό, προωορρηξιακό στάδιο. Μεγάλη αύξηση της LH σε συγκεκριμένο στάδιο του κύκλου, επάγει τη διάρρηξη ενός ή περισσοτέρων ωοθυλακίων, ανάλογα με το είδος του οργανισμού, και την απελευθέρωση του ωοκυττάρου (Knight and Glister, 2006; Hannon and Flaws, 2015).

Πριν από την ωορρηξία, πολλοί αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από το ωοκύτταρο, όπως οι BMP-6, BMP-15 και GDF-9, διασφαλίζουν τη συνέχιση της ανάπτυξης του ωοθυλακίου, αναστέλλοντας την πρόωρη ωχρινοποίησή του. Όταν το ωοκύτταρο απελευθερωθεί, οι παράγοντες αυτοί παύουν να ασκούν τη δράση τους στα γειτονικά κύτταρα και με αυτόν τον τρόπο επάγεται τελικά η δημιουργία του ωχρού σωματίου (Otsuka et al., 2001; Oktem and Urman, 2010).

1.2.6 Το ωχρό σωματίο

Το ωχρό σωματίο είναι ένας σχηματισμός που εμφανίζεται παροδικά στην ωοθήκη, μετά την ωορρηξία και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για την επίτευξη και τη διατήρηση της εγκυμοσύνης. Η προγεστερόνη η οποία παράγεται από αυτόν τον ενδοκρινή αδένα, σε περίπτωση γονιμοποίησης του ωαρίου προετοιμάζει τη μήτρα για την εμφύτευση του εμβρύου, διατηρεί τη μορφολογία της μήτρας μετά την εμφύτευση, παρεμποδίζει τις συσπάσεις και αναστέλλει την ανάπτυξη άλλων ωοθυλακίων μέχρι τη γέννα (Bachelot and Binard, 2005; Knight and Glister, 2006).

Σε πρώτο στάδιο, κατά τη δημιουργία του ωχρού σωματίου, κάποια τριχοειδή αγγεία που προηγουμένως εντοπιζόνταν μόνο στη στιβάδα των κυττάρων θήκης, εισέρχονται και στις στιβάδες των ωχρινοποιημένων κοκκιωδών κυττάρων, σχηματίζοντας το «ερυθρό σωματίο» (corpus hemorrhagicum) (Redmer and Reynolds, 1996). Στη συνέχεια, τα κοκκιώδη κύτταρα του διερρηγμένου ωοθυλακίου, διαφοροποιούνται σε μεγάλα ωχρινικά κύτταρα που παράγουν προγεστερόνη και οιστρογόνα, ενώ τα κύτταρα θήκης μετατρέπονται σε μικρά ωχρινικά κύτταρα που παράγουν προγεστερόνη και ανδρογόνα (Bachelot and Binard, 2005; Hannon and Flaws, 2015). Τα ωχρινοποιημένα κύτταρα παύουν να πολλαπλασιάζονται και παραμένουν σε διάπαυση καθόλη τη διάρκεια εμφάνισης του ωχρού σωματίου (Robker and Richards, 1998b).

Εάν δεν πραγματοποιηθεί γονιμοποίηση, τότε το ωχρό σωματίο θα αρχίσει να εκφυλίζεται μέχρι να εξαφανιστεί. Ο εκφυλισμός πραγματοποιείται μέσω φαγοκυττάρωσης, απόπτωσης και σύντηξης των κυττάρων που το αποτελούν. Η διαδικασία αυτή χαρακτηρίζεται, αρχικά, από μείωση της παραγωγής προγεστερόνης και έπειτα από μορφολογικές αλλαγές του αδένου που υποστρέφεται και σχηματίζει μία μικρή δομή συνδετικού ιστού, το «λευκό σωματίο» (corpus albicans). Το λευκό σωματίο παραμένει στην ωοθήκη για αρκετό καιρό, ακόμα και μετά την είσοδο στον επόμενο έμμηνο/οιστρικό κύκλο και στη συνέχεια συγχωνεύεται μέσα στο στρώμα της ωοθήκης (Bachelot and Binard, 2005; Pate et al., 2012).

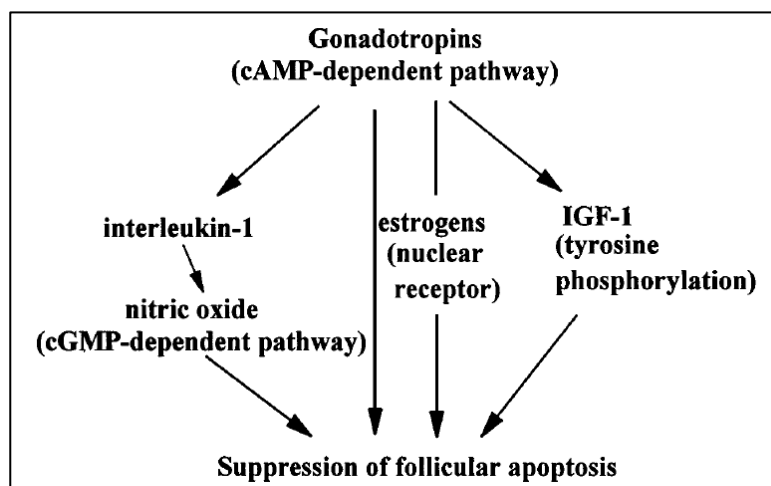
1.3 ΑΤΡΗΣΙΑ

Η απόπτωση είναι μία αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία κυτταρικού θανάτου, που παρατηρείται σε πολλά στάδια της ανάπτυξης ενός οργανισμού και είναι απαραίτητη για τη διαμόρφωσή του και τη διατήρηση της ομοιόστασής του. Κάποιοι ιστοί παρουσιάζουν αυξημένη ανανέωση κυττάρων καθόλη τη διάρκεια της ζωής, όπως το αιμοποιητικό σύστημα, το εντερικό επιθήλιο και οι όρχεις, με αποτέλεσμα η απόπτωση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός να είναι αναπόσπαστο κομμάτι της φυσιολογίας τους (Wyllie, 1987; Billig et al., 1995). Στην ωοθήκη, απόπτωση συναντάται συνεχώς και κατά την ανάπτυξη του οργάνου αλλά και κατά τη διάρκεια του έμμηνου/οιστρικού κύκλου, χωρίς όμως να ακολουθείται από ανανέωση των κυττάρων που χάνονται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση των ωοθυλακίων και τελικά, την αναπαραγωγική γήρανση (Hsueh et al., 1994).

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος καθώς και οι μηχανισμοί επιβίωσης των κυττάρων, αποτελούν δημοφιλή ερευνητικά πεδία των τελευταίων δεκαετιών. Στον ποντικό, ο αριθμός των ωοθυλακίων μειώνεται στα 2/3 λόγω ατρησίας μέσα στις πρώτες ημέρες μετά τη γέννησή του (Flaws et al., 2001). Κατά τη διάρκεια της ζωής ενός θηλυκού, περίπου το 99,9% των ωοθυλακίων δεν καταφέρνει να φτάσει στο στάδιο της ωορρηξίας και υφίστανται ατρησία (Morita and Tilly, 1999; Takagi et al., 2007).

1.3.1 Παράγοντες κυτταρικής επιβίωσης στην ωοθήκη

Η βιωσιμότητα των αρχέγονων και πρωτογενών ωοθυλακίων εξαρτάται κυρίως από παράγοντες επιβίωσης που προέρχονται από το ωοκύτταρο, όπως ο IGF-1, ο LIF και ο GDF-9 (Εικόνα 2). Αντιθέτως, στα μεγάλα προ-κοιλωματικά ωοθυλάκια μέχρι και τα προ-ωορρηξιακά, τα σήματα που θα καθορίσουν την πορεία ανάπτυξής τους, είναι εκείνα που προέρχονται κυρίως από τα κοκκιώδη κύτταρα (Morita and Tilly, 2000; Morita et al., 2001; Tilly, 2001). Στα πιο προχωρημένα αναπτυξιακά στάδια, τα κοκκιώδη κύτταρα δέχονται σήματα επιβίωσης και από το ωοκύτταρο και από τα γειτονικά κύτταρα θήκης (Yao et al., 1998), εάν όμως τα σήματα αυτά δεν είναι επαρκή, ο θάνατος ολόκληρου του ωοθυλακίου είναι αναπόφευκτος.



Εικόνα 2: Ρύθμιση της ωοθυλακικής ατρησίας (Kaipia and Hsueh, 1997)

Στους παράγοντες που παρεμποδίζουν την απόπτωση και επάγουν την επιβίωση των ωθηθικών κυττάρων, ανήκουν οι γοναδοτροπίνες της υπόφυσης, τα οιστρογόνα, κυτταροκίνες, όπως η IL-1β και αυξητικοί παράγοντες, όπως οι IGF-1, EGF/TGF-α, basic FGF (Kaipria and Hsueh, 1997).

Πιο αναλυτικά, η απότομη αύξηση των γοναδοτροπινών πριν από την ωορρηξία, έχειδειχθεί ότι συμβάλλει σημαντικά στην επιβίωση των μεγάλων προ-ωορρηξιακών ωοθυλακίων. Παρατηρήσεις από καλλιέργειες ολόκληρων ωοθυλακίων απέδειξαν ότι το αυθόρμητο ξεκίνημα της απόπτωσης παρεμποδίζεται από τις ορμόνες της υπόφυσης FSH, LH και GH (Chun et al., 1994; Eisenhauer et al., 1995), ενώ ακόμη κι αν ξεκινήσει η ατρησία, αυτή μπορεί να αποφευχθεί εάν παρέχουμε εξωγενώς γοναδοτροπίνες στα αρχικά στάδια της διαδικασίας (Braw and Tsafiriri, 1980; Braw et al., 1981; Terranova, 1981). Τα οιστρογόνα, συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των κοκκιωδών κυττάρων επάγοντας τη μεταγραφή υποδοχέων FSH, LH και προλακτίνης (Richards et al., 1979; 1980), ενώ επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ίδιων κυττάρων και μειώνουν την ατρησία μικρών προ-κοιλωματικών ωοθυλακίων σε επίμυες που έχουν υποστεί υποφυσιακή εκτομή (Williams, 1940; Payne and Hellbaum, 1955).

1.3.2 Παράγοντες κυτταρικού θανάτου στην ωοθήκη

Σε αντίθεση με τους παράγοντες επιβίωσης που αναφέρθηκαν προηγουμένως, στην ωοθήκη, αλλά και σε όλους τους ιστούς όπου τα κύτταρα υφίστανται προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, υπάρχουν παράγοντες που επάγουν προαποπτωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Σε αυτούς ανήκουν οι TNF-α και Fas ligand, ενώ βασικό ρόλο στην ωοθήκη παίζουν και τα ανδρογόνα.

Ο TNF-α και ο Fas ligand, ασκούν τη δράση τους μέσω υποδοχέων που διαθέτουν συγκεκριμένη αμινοξική αλληλουχία “κυτταρικού θανάτου” (Tartaglia et al., 1993). Πειράματα έχουν δείξει ότι ο TNF-α δρα στα κοκκιώδη κύτταρα και τα ωοκύτταρα και αυξάνει την απόπτωση αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσής του, ενώ παρόμοια είναι και η δράση του Fas ligand και στους δύο κυτταρικούς τύπους (Kaipria et al., 1996; Hakuno et al., 1996).

Όσον αφορά τα ανδρογόνα, αυτά ασκούν τη δράση τους κυρίως στα κοκκιώδη κύτταρα ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο του ωοθυλακίου και το είδος του ζώου. Στα αρχικά στάδια της ωοθυλακιογένεσης, φαίνεται να υποβοηθούν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων τόσο άμεσα (Murray et al., 1998; Wang et al., 2001), όσο και έμμεσα, ενισχύοντας τη δράση της FSH και επάγοντας τον IGF-I και τον υποδοχέα του (Hillier et al., 1977; 1981; Vendola et al., 1999). Εκτός, όμως, από τη συμμετοχή τους στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων, τα ανδρογόνα φαίνεται να έχουν και αντίθετη δράση, υποβοηθώντας την ατρησία (Hillier and Ross, 1979; Bagnell et al., 1982; Conway et al., 1990). Πειράματα έδειξαν ότι μία ένεση διυδροτεστοστερόνης σε θηλυκό ποντικό, μπορεί να μειώσει τον αριθμό των αναπτυγμένων ωοθυλακίων μέχρι και στο 50%, με αποτέλεσμα την πρόκληση υπογονιμότητας (Nandedkar and Munshi, 1981). Επιπλέον, στον αρουραίο, τα ανδρογόνα αναστέλλουν την έκφραση των υποδοχέων της LH στα κοκκιώδη κύτταρα και επάγουν την απόπτωση των κυττάρων αυτών (Farookhi, 1980; Jia et al., 1985; Billig et al., 1993)

Τέλος, η συσχέτισή τους με την ατρησία υποδεικνύεται κι από την αύξηση της συγκέντρωσής τους στα ατρητικά ωοθυλάκια. Αυτό συμβαίνει γιατί στα εν λόγω ωοθυλάκια παρατηρείται μείωση της ενεργότητας της αρωματάσης, που οδηγεί σε μειωμένη μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα και άρα συσσώρευση ανδρογόνων (Louvet et al., 1975; Zeleznik et al., 1979). Έτσι, στο ωοθυλακικό υγρό των ατρητικών ωοθυλακίων, ο λόγος των οιστρογόνων προς τα ανδρογόνα είναι χαμηλός (Carson et al., 1981), μία ένδειξη που μπορεί να βοηθήσει στη διάκριση των υγιών ωοθυλακίων από τα ατρητικά.

1.3.3 Ατρησία στα διάφορα στάδια ωοθηκικής ανάπτυξης

Η διαδικασία απόπτωσης των κυττάρων της ωοθήκης, μπορεί να ταξινομηθεί σε διάφορες κατηγορίες, ανάλογα με το στάδιο στο οποίο πραγματοποιείται, τα κύτταρα τα οποία επηρεάζονται αλλά και τα μονοπάτια που συμμετέχουν.

Όσον αφορά το στάδιο στο οποίο πραγματοποιείται, διακρίνονται δύο κατηγορίες απόπτωσης:

α) Ο εκφυλισμός γαμετικών κυττάρων (germ cell attrition), που πραγματοποιείται κυρίως κατά την περίοδο πριν από τη γέννηση και προκαλεί απώλεια πολύ μεγάλου ποσοστού κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, σημαντικός αριθμός ωογονίων αποπίπτουν μετά τη μετανάστευσή τους στην αρχέγονη ωοθήκη, ενώ αυτό συμβαίνει και μεταγενέστερα σε ωοκύτταρα που δεν περιβάλλονται από στιβάδα κοκκιωδών κυττάρων και, άρα, δεν μπορούν να προχωρήσουν στο σχηματισμό αρχέγονων ωοθυλακίων (Beaumont and Mandl, 1962; Ohno and Smith, 1964). Πολύ σημαντικός παράγοντας για τη ρύθμιση της απόπτωσης σε αυτό το στάδιο είναι ο Bcl-2, διαγραφή του οποίου προκαλεί υπερβολική απώλεια γαμετικών κυττάρων σε μία ωοθήκη και σχηματισμό δομών που μοιάζουν με ωοθυλάκια αλλά δεν περικλείουν γαμετικά κύτταρα (Ratts et al., 1995).

β) Ο εκφυλισμός ωοθυλακίων (follicle atresia), που παρατηρείται κατά τη μεταγεννητική ανάπτυξη της ωοθήκης. Είναι μία διαδικασία που ρυθμίζεται, συχνά, από τις ορμόνες, συναντάται σε όλα τα στάδια της ωοθυλακιογένεσης, αλλά παίζει πιο σημαντικό ρόλο στο στάδιο επιλογής των ωοθυλακίων που θα προχωρήσουν σε ωορρηξία (Hsueh et al., 1994). Η επιλογή τους πραγματοποιείται κυρίως με τη βοήθεια της FSH και μόνο εάν υπάρχει η σωστή σηματοδότηση από την ορμόνη αυτή, μπορεί να παρεμποδιστεί η ατρησία και τα επιλεγμένα ωοθυλάκια να περάσουν στο προ-ωορρηξιακό στάδιο (Schwartz, 1974; Hirshfield and Midgley, 1978; Gougeon, 1993; Chun et al., 1996).

Από την άλλη, όσον αφορά τα μοτίβα κυτταρικού θανάτου που ακολουθούνται στην κοκκιώδη στιβάδα των ωοθυλακίων, η Irving – Rodgers και οι συνεργάτες της διακρίνουν δύο κατηγορίες (Irving-Rodgers et al., 2001):

α) Τον κυτταρικό θάνατο που παρατηρείται αρχικά στα κοκκιώδη κύτταρα που βρίσκονται πιο κοντά στο άντρο και μπορεί να ξεκινά είτε από τα κοκκιώδη είτε από το ίδιο το ωοκύτταρο (antral atresia), και

β) Τον κυτταρικό θάνατο που παρατηρείται πρώτα στα κοκκιώδη που βρίσκονται πιο κοντά στη βασική μεμβράνη και ίσως ξεκινά από εξωτερικούς παράγοντες.

1.3.4 Ο ρόλος της ωοθυλακικής ατρησίας

Η ατρησία αποτελεί τον βασικό τρόπο απόρριψης των προβληματικών ή πλεονασματικών ωοθυλακίων και παρεμποδίζεται μόνο στα επιλεγμένα υγιή ωοθυλάκια, που θα συνεχίσουν την ανάπτυξή τους μέχρι την ωορρηξία ή θα εκφυλιστούν σε κάποιο μεταγενέστερο αναπτυξιακό στάδιο. Η μοίρα κάθε ωοθυλακίου καθορίζεται από την τελική επικράτηση των παραγόντων επιβίωσης ή των παραγόντων κυτταρικού θανάτου, οι οποίοι εξαρτώνται και από το αναπτυξιακό στάδιο κάθε ωοθυλακίου (Kairia and Hsueh, 1997):

- 1) Προκοιλωματικά ωοθυλάκια (preantral): απαντούν σε μηνύματα από τις γοναδοτροπίνες αλλά αναπτύσσονται και χωρίς σηματοδότηση από αυτές. Παρόλα αυτά, είναι πολύ σημαντικό να δέχονται μηνύματα επιβίωσης, χωρίς τα οποία προχωρούν σε απόπτωση.
- 2) Πρώιμα κοιλωματικά ωοθυλάκια (early antral): παρότι υπάρχουν κι άλλοι παράγοντες που παρεμποδίζουν την απόπτωση των ωοθυλακίων, όπως ο IGF-I, η IL-1 β και η LH, τον πιο βασικό ρόλο, σε αυτό το στάδιο, παίζει η FSH. Στο στάδιο αυτό, η ατρησία είναι πολύ συχνό φαινόμενο, επομένως για να μπορέσουν τα ωοθυλάκια να επιβιώσουν και να συνεχίσουν την ωρίμανσή τους μέχρι την ωορρηξία, θα πρέπει να λάβουν όλα τα βασικά μηνύματα επιβίωσης και κυρίως, την απαραίτητη σηματοδότηση από την FSH.
- 3) Προ-ωορρηξιακά ωοθυλάκια (preovulatory): η εξασφάλιση της επιβίωσής τους εξαρτάται από την κατάλληλη σηματοδότηση από πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων οι γοναδοτροπίνες, οι IGF-I, EGF, IL- β , NO και τα οιστρογόνα.

1.4 ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ

Η ωοθήκη των θηλαστικών, εκτός από την παραγωγή των θηλυκών γαμετικών κυττάρων, πραγματοποιεί και την πολύ σημαντική διαδικασία της παραγωγής στεροειδών ορμονών, δηλαδή οιστρογόνων, ανδρογόνων και προγεστερόνης. Οι στεροειδείς ορμόνες δρουν όχι μόνο στις δομές του αναπαραγωγικού συστήματος, όπως είναι η ωοθήκη, η μήτρα, οι μαστικοί αδένες και η υπόφυση, αλλά και σε άλλους ιστούς που δε σχετίζονται με την αναπαραγωγική λειτουργία, όπως το καρδιαγγειακό σύστημα, ο λιπώδης ιστός και τα οστά. Στην πρώτη περίπτωση, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των αναπαραγωγικών οργάνων και των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου, στην ωορρηξία, τη γονιμοποίηση, την εμφύτευση του ζυγωτού και όλη τη διαδικασία της κύησης (Davis et al., 1994; Couse and Korach, 1998; Findlay et al., 2001; Britt and Findlay, 2002). Στη δεύτερη περίπτωση, η αλληλεπίδραση των στεροειδών ορμονών με μη αναπαραγωγικούς ιστούς έχει αποδειχθεί στην περίπτωση της οστεοπόρωσης, με χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση και χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης σε άνδρες προχωρημένης ηλικίας (Kloner et al., 2016; Almeida et al., 2017). Επιπλέον, επιδημιολογικές μελέτες σε γυναίκες με πρόωρη απώλεια της ωοθηκικής λειτουργίας υποδεικνύουν ότι οι γυναίκες αυτές έχουν μεγαλύτερο ρίσκο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων (Wellons, 2011).

Στη στεροειδογένεση συμβάλλουν κυρίως τα ώριμα ωοθυλάκια και τα ωχρά σωμάτια. Τα πρώτα, κατά την περι – ωορρηξιακή περίοδο, αυξάνουν τη σύνθεση οιστραδιόλης (E2) η οποία θα προκαλέσει την απαραίτητη αύξηση της LH για την πρόκληση της ωορρηξίας. Επιπλέον, συντίθεται και εκκρίνεται από αυτά, προγεστερόνη η οποία, εκτός από το να υποβοηθήσει την ωορρηξία, θα συμβάλλει και στο σχηματισμό του ωχρού σωματίου. Τα ωχρά σωμάτια, με τη σειρά τους, παράγουν κυρίως προγεστερόνη, καθώς και άλλες στεροειδείς ορμόνες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Craig et al., 2011; Hannon and Flaws, 2015).

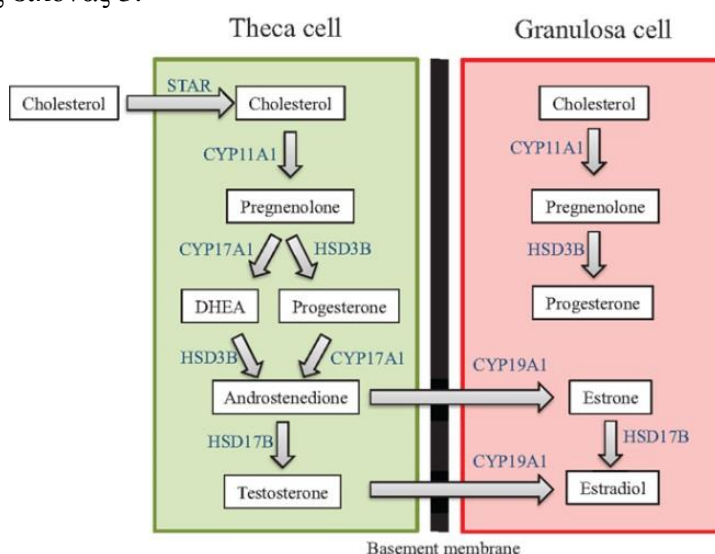
Η στεροειδογένεση στα περισσότερα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου του ποντικού και του ανθρώπου, φαίνεται ότι ακολουθεί το μοντέλο των «δύο κυττάρων – δύο γοναδοτροπινών». Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, τα κοκκιώδη κύτταρα και τα κύτταρα θήκης συνεργάζονται για την παραγωγή των στεροειδών ορμονών (Falck, 1959; Richards, 1980).

Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα θήκης διαθέτουν υποδοχείς LH (Lutenizing hormone/chorionadotropin receptor – LHCGR), στους οποίους προσδένεται η ωχρινότροπος ορμόνη και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα απαραίτητα για τη μετατροπή της χοληστερόλης σε ανδρογόνα (ανδροστενεδιόνη και τεστοστερόνη) (Channing and Kammerman, 1974; Richards, 1980). Από την άλλη, τα κοκκιώδη κύτταρα διαθέτουν υποδοχείς FSH (Follicle stimulating hormone receptor – FSHR), στους οποίους προσδένεται η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που θα δώσουν ένζυμα απαραίτητα για τη μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα (17β-οιστραδιόλη και οιστρόνη) (Carson et al., 1979; Richards, 1980).

Η στεροειδογένεση χρησιμοποιεί ως αρχικό συστατικό τη χοληστερόλη, η οποία είτε εισέρχεται στα κύτταρα θήκης μέσω λιποπρωτεϊνικών υποδοχέων, είτε συντίθεται σε αυτά *de novo*. Η χοληστερόλη που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, μετατοπίζεται από την εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων στην εσωτερική, όπου βρίσκονται τα περισσότερα ένζυμα της στεροειδογένεσης, με τη βοήθεια της StAR (Strauss et al. 1999, Christenson & Strauss 2000, Stocco 2001). Η StAR είναι πολύ σημαντικός ρυθμιστής της στεροειδογένεσης, δεδομένου ότι καθορίζει την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος αυτής της διαδικασίας σε όλους τους ιστούς στους οποίους παράγονται στεροειδείς ορμόνες όπως τα επινεφρίδια, οι όρχεις και οι ωοθήκες (Jamnongjit and Hammes, 2006).

Μετά την είσοδό της στα μιτοχόνδρια, η χοληστερόλη μετατρέπεται από το ένζυμο CYP11A1 (ή CYP450scc) σε πρεγνολόνη, η οποία διαχέεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Miller, 1988; Hanukoglu, 1992). Εκεί θα τροποποιηθεί είτε σε προγεστερόνη από το ένζυμο HSD3B, είτε σε διϋδροεπιανδροστενεδιόνη (DHEA) από το CYP17A1 και αυτά τα ένζυμα, στη συνέχεια, θα μετατρέψουν την προγεστερόνη και την DHEA σε ανδροστενεδιόνη. Στο τελευταίο βήμα της στεροειδογένεσης που λαμβάνει χώρα στα κύτταρα θήκης, η ανδροστενεδιόνη θα τροποποιηθεί εν μέρει σε τεστοστερόνη, από το HSD17B και τα δύο αυτά στεροειδή θα διαχυθούν μέσω της βασικής μεμβράνης στα κοκκιώδη κύτταρα (Penning, 1997; Hanukoglu, 1992).

Στα κοκκιώδη κύτταρα, η ανδροστενεδιόνη και η τεστοστερόνη θα δώσουν οιστρόνη και οιστραδιόλη, αντίστοιχα, με τη βοήθεια του ενζύμου CYP19A1, που αναφέρεται συχνά και ως αρωματάση. Οιστραδιόλη συντίθεται, επίσης, από οιστρόνη με τη δράση του 17β-HSD (Hanukoglu, 1992; Penning, 1997). Η αρωματάση είναι ένα από τα πιο βασικά ένζυμα της στεροειδογένεσης, καθώς καθορίζει τα επίπεδα παραγωγής οιστρογόνων από την ωοθήκη, ορμόνες απαραίτητες για τη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος. Μετά τη σύνθεσή της από τεστοστερόνη ή από οιστρόνη, η οιστραδιόλη μπορεί να μεταβολιστεί σε άλλες μορφές για την απενεργοποίησή της (Tsuchiya et al., 2005). Η παραπάνω διαδικασία μπορεί να γίνει εύκολα κατανοητή και σχηματικά, με τη βοήθεια της εικόνας 3.



Εικόνα 3: Μοντέλο δύο κυττάρων – δύο γοναδοτροπινών (Hannon and Flaws, 2015).

Τόσο τα κύτταρα θήκης όσο και τα κοκκιώδη κύτταρα εκφράζουν τα ένζυμα StAR, CYP11A1 και 3β-HSD και επομένως μπορούν να συνθέσουν πρεγνονολόνη και προγεστερόνη από χοληστερόλη. Όσο όμως βρισκόμαστε στη φάση του αναπτυσσόμενου ωοθυλακίου, τα κοκκιώδη κύτταρα δεν επικοινωνούν με αγγεία του κυκλοφορικού, με αποτέλεσμα να έχουν μειωμένη διαθεσιμότητα σε οξυγόνο και χοληστερόλη, άρα να παράγουν πολύ μικρά ποσοστά αυτών των στεροειδών. Όταν τελικά τα κύτταρα αυτά μετατραπούν σε ωχρινικά, αποκτούν πλέον την ικανότητα σύνθεσης πρεγνονολόνης και προγεστερόνης (Wood and Strauss, 2002; Havelock et al., 2004). Θεωρείται, μάλιστα, ότι αποτελούν τους κύριους «προμηθευτές» προγεστερόνης, συγκριτικά με τα ωχρινικά κύτταρα θήκης, εφόσον δε διαθέτουν το ένζυμο CYP17A1 και άρα δεν μπορούν να μετατρέψουν τις ενώσεις αυτές σε ανδρογόνα (Jamnongjit and Hammes, 2006).

Φαίνεται, λοιπόν, πως το μοντέλο των δύο κυττάρων ακολουθείται και στη φάση του ωχρού σωματίου όπου τα μικρά ωχρινικά κύτταρα που προέρχονται από τα κύτταρα θήκης παράγουν ανδρογόνα και προγεστερόνη, ενώ τα μεγάλα ωχρινικά κύτταρα που προέρχονται από τα τοιχωματικά κοκκιώδη, παράγουν οιστραδιόλη και προγεστερόνη (Ohara et al., 1987; Sanders and Stouffer, 1997).

1.5 FSH – LH

Ο άξονας Υποθάλαμος – Υπόφυση – Γονάδες παίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης του αναπαραγωγικού συστήματος, σε όλη τη διάρκεια της ζωής. Πιο συγκεκριμένα, ο υποθάλαμος δίνει σήμα στο πρόσθιο τμήμα της υπόφυσης, μέσω της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (Gonadotropin releasing hormone ή GnRH), ώστε να συντεθούν και να εκκριθούν οι γοναδοτροπίνες της υπόφυσης, FSH και LH (Vale et al., 1977; Seeburg et al., 1987). Οι ορμόνες αυτές μεταφέρονται μέσω του κυκλοφορικού συστήματος στην ωθήκη, όπου δίνουν κατάλληλα μηνύματα για την ανάπτυξη και τη σωστή λειτουργία της. Η σηματοδότηση από τις γοναδοτροπίνες εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωσή τους η οποία τροποποιείται συνεχώς κατά τη διάρκεια του έμμηνου/οιστρικού κύκλου.

1.5.1 Ο ρόλος των γοναδοτροπινών

Τα αρχικά στάδια της ωοθυλακιογένεσης είναι ανεξάρτητα από τις γοναδοτροπίνες της υπόφυσης, αυτές όμως γίνονται απαραίτητες για την ανάπτυξη σε μετέπειτα στάδια, καθώς ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη λειτουργία των σωματικών κυττάρων που περιβάλλουν το ωοκύτταρο (Edson et al., 2009). Στα τρωκτικά, η απόκριση στις γοναδοτροπίνες ξεκινά στο όψιμο-προκοιλωματικό στάδιο, ενώ στα πρωτεύοντα αυτό συμβαίνει μετά την εμφάνιση του άντρου (Knight and Glistler, 2006). Παρόλα αυτά, έκφραση του υποδοχέα της FSH έχει παρατηρηθεί και στον άνθρωπο αλλά και στα τρωκτικά, από το στάδιο του πρωτογενούς ωοθυλακίου (Oktaý et al., 1997; Rice et al., 2007; Fenwick et al., 2011).

Σε ενήλικα θηλυκά, στο ξεκίνημα του νέου έμμηνου/οιστρικού κύκλου, η FSH αυξάνεται λόγω της μειωμένης αρνητικής ανατροφοδότησης από την ωθήκη προς τον υποθάλαμο και την υπόφυση. Αυτό οφείλεται στη μείωση της παραγωγής στεροειδών από την ωθήκη μετά την ωορρηξία, καθώς υποστρέφουν τα ωχρά σωματίδια που έχουν δημιουργηθεί (Kumar and Sait, 2011). Σε αυτή τη φάση, ωοθυλάκια που διαθέτουν τους κατάλληλους υποδοχείς, απαντούν στα σήματα της FSH, εκφράζουν απαραίτητα γονίδια για τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων, καθώς και για την απόκριση σε σήματα από την LH (LHCGR), αλλά και για τη σύνθεση της απαραίτητης ποσότητας οιστρογόνων (μέσω της αρωματάσης) (Fan et al., 2008).

Σε πιο προχωρημένα ωοθυλακικά στάδια, η δράση της FSH υποβοηθάται από την ακτιβίνη και τα παραγόμενα οιστρογόνα με αποτέλεσμα να επάγεται περαιτέρω η παραγωγή πρωτεϊνών όπως η αρωματάση και η κυκλίνη D2, ένας σημαντικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου (Park et al., 2005; Hunzicker – Dunn and Maizels, 2006; Deroo et al., 2009). Τα οιστρογόνα, όμως, παίζουν και έναν αντίθετο ρόλο στη δράση της FSH. Μαζί με την ινχιπίνη, που εκφράζεται επίσης από τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, δημιουργούν αρνητική ανατροφοδότηση προς τον υποθάλαμο και την υπόφυση, μειώνοντας τελικά τα επίπεδα της εκκρινόμενης FSH (Kumar and Sait, 2011).

Αυτή η διαδικασία βοηθά σημαντικά την επιλογή των προ-κοιλωματικών και πρώιμων κοιλωματικών ωοθυλακίων που θα συνεχίσουν μέχρι την ωορρηξία. Πιο συγκεκριμένα, μόνο τα ωοθυλάκια με αυξημένη έκφραση αρωματάσης, FSHR και LHCGR θα μπορέσουν να ανταποκριθούν στα χαμηλά, πλέον, επίπεδα της FSH και των παρεχόμενων υποστρωμάτων για τη συνέχιση της στεροειδογένεσης και την αποφυγή του εκφυλισμού τους (Octem and Urman 2010; Kumar and Sait, 2011). Επιπλέον, σε αυτό το στάδιο, χαμηλά επίπεδα LH επάγουν τη στεροειδογένεση χωρίς να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Kumar and Sait, 2011).

Μία απότομη αύξηση της LH (LH surge) σε μετέπειτα στάδιο του έμμηνου/οιστρικού κύκλου, όμως, θα αναστείλει τη μίτωση των κοκκιωδών κυττάρων, θα επάγει τη συνέχιση της μείωσης στο ωοκύτταρο και θα πυροδοτήσει τελικά τη διαδικασία της ωορρηξίας και της ωχρινοποίησης (Shimada et al., 2006; Hernandez-Gonzalez et al., 2006). Έχει προταθεί ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο κάθε ωοθυλάκιο έχει ένα μέγιστο επίπεδο απόκρισης στην LH, πέρα από το οποίο σταματά η ωρίμανσή του και ξεκινάει ο εκφυλισμός (Hillier et al., 1994). Τα επιλεγμένα ωοθυλάκια που έχουν αναπτυχθεί αρκετά, θα έχουν μεγαλύτερο «όριο» σε σχέση με τα μη επιλεγμένα, με αποτέλεσμα τα δεύτερα να μην ανταποκρίνονται κατάλληλα στα σήματα της LH και, τελικά, να εκφυλίζονται (Kumar and Sait, 2011).

1.5.2 Ρύθμιση γοναδοτροπινών

Κατά τη διάρκεια του έμμηνου/οιστρικού κύκλου, διάφοροι παράγοντες ρυθμίζουν τις συγκεντρώσεις των γοναδοτροπινών της υπόφυσης. Τέτοιοι παράγοντες είναι οι στεροειδείς ορμόνες, όπως τα οιστρογόνα, η προγεστερόνη, τα ανδρογόνα και τα γλυκοκορτικοειδή (Burger et al., 2004; Thackray et al., 2006), αλλά και πεπτιδικές ορμόνες, όπως η ακτιβίνη, η ινχιπίνη και η φολλιστατίνη, οι οποίες αποτελούν στοιχεία του συστήματος ανατροφοδότησης από την ωοθήκη προς τον υποθάλαμο και την πρόσθια υπόφυση (Thackray et al., 2010).

Ο πιο σημαντικός ρυθμιστής των γοναδοτροπινών, όμως, είναι η GnRH του υποθαλάμου. Διαφορετικές συχνότητες σηματοδότησης από την ορμόνη αυτή, ρυθμίζουν με ξεχωριστό τρόπο την έκκριση των FSH και LH. Αυτό συμβαίνει γιατί τα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες LHβ και FSHβ, αποκρίνονται με διαφορετικό τρόπο στις αλλαγές της συχνότητας και του μεγέθους των παλμών της GnRH (Ferris and Shupnik, 2006; Burger et al., 2008; Thackray et al., 2010). Πιο αναλυτικά, παλμοί χαμηλής συχνότητας προκαλούν σχετική αύξηση των επιπέδων της FSH που θα επάγουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων στα πρώτα στάδια του κύκλου. Σε μετέπειτα στάδιο, παλμοί αυξημένης συχνότητας προκαλούν απότομη αύξηση των επιπέδων της FSH και κυρίως της LH, κάτι που τελικά θα πυροδοτήσει την ωορρηξία και το σχηματισμό του ωχρού σωματίου (Richards and Pangas, 2010).

Συγκεκριμένα στα τρωκτικά, η πρώτη αύξηση της FSH πραγματοποιείται το πρωί του οίστρου με σκοπό την ανάπτυξη του επόμενου κύκλου ωοθυλακίων, ενώ η απότομη αύξηση FSH και LH λαμβάνει χώρα το απόγευμα του πρόοιστρου και οδηγεί σε ωορρηξία (DePaolo et al., 1979; Papavasiliou et al., 1986; Woodruff et al., 1996; Jones, 1997).

1.6 FSHR

Η FSH, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ασκεί τη δράση της μέσω ειδικών διαμεμβρανικών υποδοχέων οι οποίοι εντοπίζονται στα κοκκιώδη κύτταρα της ωοθήκης και τα κύτταρα Sertoli των όρχεων (Richards and Midgley, 1976; Fritz, 1978). Οι υποδοχείς αυτοί ανήκουν στην οικογένεια των G – protein coupled receptors (GPCRs), δρουν ενεργοποιώντας διάφορα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της ωοθήκης και την πραγματοποίηση του έμμηνου/οιστρικού κύκλου (Dierich, 1998; Peltoketo, 2010).

Ο ρόλος του FSHR έχει γίνει κατανοητός μέσα από τη μελέτη μεταλλάξεων που τροποποιούν τη φυσιολογική λειτουργία του, είτε αναστέλλοντάς την, είτε επάγοντάς τη σε πολύ μεγάλο βαθμό (Dierich, 1998; Abel et al., 2000; Peltoketo, 2010).

1.6.1 Απενεργοποίηση του *Fshr*

Πειράματα με ΚΟ ποντίκια για το γονίδιο *Fshr*, έχουν αποδείξει ότι απουσία του υποδοχέα ο κόλπος παραμένει κλειστός, οι ωοθήκες και η μήτρα εμφανίζουν μειωμένο μέγεθος, ενώ δεν υπάρχουν ενδείξεις για την πραγματοποίηση οιστρικού κύκλου. Όσον αφορά την ιστολογία των ωοθηκών, σε αυτές εντοπίζονται ωοθυλάκια διαφόρων σταδίων ανάπτυξης μέχρι και το στάδιο πριν από την εμφάνιση του άντρου, ενώ δεν παρατηρούνται κοιλωματικά ωοθυλάκια ή ωχρά σωματίδια. Όλα τα παραπάνω έχουν άμεση συνέπεια τα ΚΟ θηλυκά να είναι στείρα (Abel et al., 2000).

Όσον αφορά τις γοναδοτροπίνες της υπόφυσης στα ίδια ζώα, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα FSH και LH στον ορό του αίματος, κάτι που υποδεικνύει απουσία φυσιολογικής αρνητικής ανάδρασης από τις ωοθήκες στον υποθάλαμο και την υπόφυση. Παρά τα αυξημένα επίπεδα των γοναδοτροπινών, η απουσία του υποδοχέα φαίνεται να παρεμποδίζει τη φυσιολογική σύνθεση και έκκριση οιστρογόνων αλλά και ινχιμπίνης (Richards, 1980; Rivier et al., 1986; Woodruff and Mayo, 1990).

1.6.2 Συνεχής ενεργοποίηση του *Fshr*

Από την άλλη, μεταλλαγές που προκαλούν συνεχή ενεργοποίηση του υποδοχέα, φαίνεται να έχουν επίσης καταστροφικά αποτελέσματα για το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα. Πειράματα από τον Peltoketo και τους συνεργάτες του, έδειξαν ότι συγκεκριμένη μετάλλαξη του *Fshr* (*mFshrD580H*) στα κοκκιώδη κύτταρα, οδηγεί σε μη φυσιολογική μορφολογία και λειτουργία της ωοθήκης, παρουσία αιμορραγικών κύστεων, ταχύτατη απώλεια μικρών ωοθυλακίων, αυξημένο πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων, αυξημένη σύνθεση οιστραδιόλης καθώς και ωχρινοποιημένα ωοθυλάκια που δεν έχουν προηγουμένως διαρρηχθεί (Peltoketo, 2010). Η έκφραση του διαγονιδίου, δεν είχε εμφανή αποτελέσματα σε δείκτες ανάπτυξης των θηλυκών ποντικών όπως το άνοιγμα του κόλπου (vaginal opening – VO) και η απόσταση μεταξύ πρωκτού και γεννητικών οργάνων (anogenital distance – AGD). Όμως στο 63% εφανίστηκαν ανωμαλίες στον οιστρικό τους κύκλο και πιο συγκεκριμένα, απουσία προοίστρου και οίστρου. Παρόλα αυτά, όσα θηλυκά παρουσίαζαν φυσιολογικό κύκλο, ήταν γόνιμα και απέκτησαν περισσότερους απογόνους από ότι τα φυσιολογικά ζώα (Peltoketo, 2010).

1.7 ΟΙΣΤΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το αναπαραγωγικό σύστημα αλλά και η σεξουαλική δεκτικότητα των θηλυκών θηλαστικών χαρακτηρίζεται από κυκλικές μεταβολές οι οποίες αποτελούν τον έμμηνο ή οιστρικό κύκλο, ανάλογα με το είδος στο οποίο αναφερόμαστε. Οι ποντικοί, όπως και τα λοιπά τρωκτικά, αποτελούν παραδείγματα πολυοιστρικών θηλαστικών, δηλαδή θηλαστικών που εμφανίζουν πολλούς οιστρικούς κύκλους καθόλη τη διάρκεια του χρόνου (Hill, 2016).

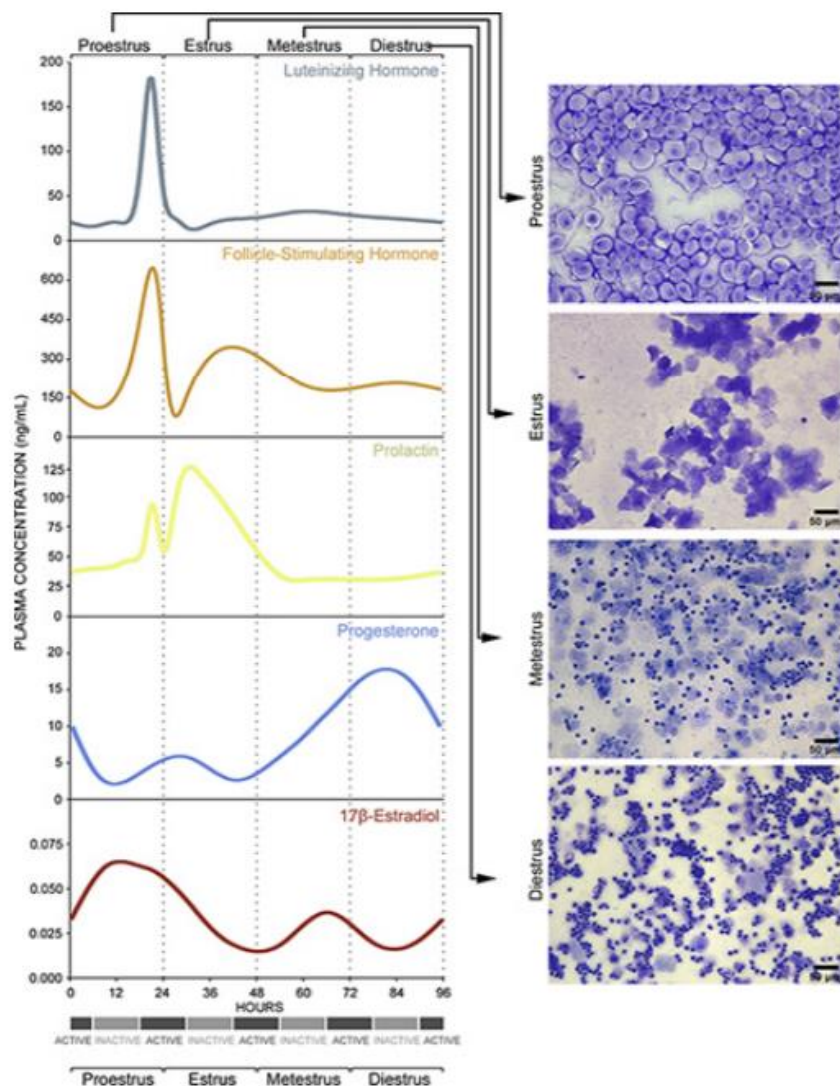
Στα τρωκτικά, η ωρίμανση του αναπαραγωγικού συστήματος και η είσοδος στην εφηβεία σηματοδοτείται από το άνοιγμα του κόλπου (vaginal opening, VO), μία διαδικασία που διαμεσολαβείται από απόπτωση και επάγεται από την αύξηση των επιπέδων των οιστρογόνων (Ojeda and Urbancki, 1994; Rodriguez et al., 1997). Το VO αποτελεί το βασικότερο δείκτη έναρξης της εφηβείας των θηλυκών, γι' αυτό και μελετάται πολύ συχνά σε σχετικές ερευνητικές εργασίες. Όσον αφορά τον ποντικό, παρατηρείται συνήθως στις 24 – 28 ημέρες μετά τη γέννηση, ενώ σε κάποια στελέχη εμφανίζεται αργότερα, μεταξύ 35 και 40 ημερών (Silver, 1995).

Ο πρώτος οιστρικός κύκλος εμφανίζεται λίγες ημέρες μετά το άνοιγμα του κόλπου (Nelson et al., 1982). Ο φυσιολογικός κύκλος ενός ποντικού που εκτρέφεται στο εργαστήριο, διαρκεί από 4 έως 6 ημέρες και με βάση τις αλλαγές που πραγματοποιούνται στη φυσιολογία, τη μορφολογία και τη συμπεριφορά του ζώου, χωρίζεται σε 4 φάσεις (Silver, 1995; Caligioni, 2010) (Εικόνα 4):

- 1) Πρόοιστρος: χαρακτηρίζεται από την ωρίμανση μίας νέας ομάδας ωοθυλακίων και άνοιγμα του κόλπου. Παρατηρείται αύξηση των επιπέδων οιστραδιόλης (E2) και, στη συνέχεια, αύξηση των γοναδοτροπινών της υπόφυσης (Walmer et al, 1992).
- 2) Οίστρος: ξεκινά με την ωορρηξία των ωοθυλακίων που έχουν ωριμάσει πλήρως, διαδικασία που επάγεται από την αύξηση των γοναδοτροπινών (Parkening et al., 1982). Τα οιστρογόνα παραμένουν σε υψηλά επίπεδα όλο το πρωί και πέφτουν στα βασικά επίπεδα το μεσημέρι (Walmer et al, 1992). Ο κόλπος παραμένει ανοικτός και το θηλυκό είναι δεκτικό σε κινήσεις από το αρσενικό. Σε ποντικούς που διαβιούν σε συγκεκριμένο κύκλο φωτός – σκότους, η φάση αυτή συνήθως ξεκινά αμέσως μετά τα μεσάνυχτα και διαρκεί για 6 – 8 ώρες.
- 3) Μέθοιστρος: τα ωάρια μετακινούνται μέσω των ωαγωγών στη μήτρα, μεγάλα ωχρά σωμάτια εκκρίνουν ορμόνες, ενώ ο κόλπος είναι πια κλειστός. Εάν πραγματοποιηθεί γονιμοποίηση, ακολουθούν ορμονικές μεταβολές που προετοιμάζουν τη μήτρα για την κυοφορία. Εάν δεν επιτευχθεί γονιμοποίηση, τότε ακολουθεί η τελευταία φάση του κύκλου.
- 4) Δίοιστρος: τα μη γονιμοποιημένα ωάρια απαλείφονται από το αναπαραγωγικό σύστημα και ο κόλπος φτάνει στο μικρότερο δυνατό μέγεθος. Τα επίπεδα E2 αρχίζουν να αυξάνονται, προετοιμάζοντας την ωοθήκη για τον επόμενο κύκλο.

Οι φάσεις του πρόοιστρου και του οίστρου καλούνται «ωοθυλακική φάση», ενώ ο μέθοιστρος και ο δίοιστρος αποτελούν την «ωχρινική φάση» του κύκλου. Σε κάθε φυσιολογικό κύκλο, 6 έως 16 ωοθυλάκια θα ωριμάσουν και στις δύο ωοθήκες και θα συμμετέχουν σε πιθανή γονιμοποίηση (Silver, 1995).

Ο προσδιορισμός των σταδίων του οιστρικού κύκλου, πραγματοποιείται είτε μακροσκοπικά με παρατήρηση της μορφολογίας του κόλπου, είτε μικροσκοπικά, παίρνοντας κολπικά εκπλύματα/επιχρίσματα και εξετάζοντας τη μορφολογία των κυττάρων, συνήθως αλλά όχι απαραίτητα, μετά από κάποια χρώση. Η μικροσκοπική μέθοδος θεωρείται και η πιο ακριβής (Hill, 2016).



Εικόνα 4: Ορμονικές και κυτταρολογικές αλλαγές κατά τη διάρκεια του οιστρικού κύκλου (McLean et al., 2012)

1.8 ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ

Σύμφωνα με την Αμερικανική Ενδοκρινολογική Εταιρεία: «Ενδοκρινικός διαταράκτης (Endocrine – disrupting chemical ή EDC) είναι ένα εξωγενές χημικό ή ένα μίγμα χημικών που μπορεί να παρέμβει σε οποιοδήποτε στάδιο δράσης των ορμονών». Όπως φανερώνει και το όνομά τους, οι χημικές αυτές ενώσεις, έχουν την ικανότητα να παρεμβαίνουν στη φυσιολογική λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος, διαταράσσοντας τη σύνθεση, έκκριση, δράση και αποικοδόμηση των ορμονών, γεγονότα που χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλομορφία στη διάρκεια της ζωής (Zoeler et al., 2012).

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες με βάση την ταχύτητα διάσπασής τους και απομάκρυνσής τους από τον οργανισμό και το περιβάλλον:

A) Εμμένοντα EDCs (Persistent EDCs)

Κάποια EDCs κατασκευάστηκαν ώστε να έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής, ένα σημαντικό πλεονέκτημα για τη βιομηχανική τους χρήση, αλλά ταυτόχρονα πολύ καταστροφικό για το περιβάλλον. Οι αρνητικές τους επιπτώσεις οφείλονται στο ότι οι ενώσεις αυτές δε μεταβολίζονται εύκολα και, στην περίπτωση που μεταβολιστούν, τα παράγωγα που προκύπτουν μπορεί να είναι ακόμη πιο τοξικά από τη μητρική ένωση (Kidd et al., 2012). Λόγω αυτού, πολλά από τα EDCs που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία εντοπίζονται στο περιβάλλον σε μεγάλες ποσότητες, σε οικοσυστήματα πολύ μακριά από τον τόπο παραγωγής και χρήσης τους, ακόμα και πολλά χρόνια μετά την απαγόρευσή τους (Porte et al., 2006; Calafat and Needham, 2007).

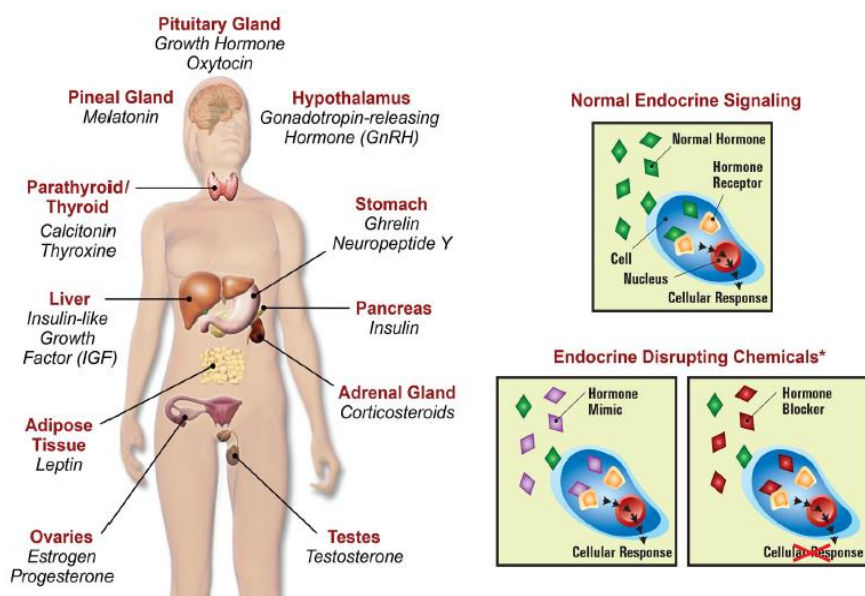
Ένα παράδειγμα αποτελούν τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) που χρησιμοποιούνταν εκτεταμένα μέχρι και τη δεκαετία του '70 οπότε και απαγορεύτηκε η χρήση τους. Λόγω της φύσης τους, παρουσιάζουν μειωμένη διαλυτότητα στο νερό και αυξημένη διαλυτότητα σε ενώσεις λιπιδικής φύσεως, χαρακτηριστικό που υποβοηθά τη βιοσυσσώρευσή τους στο λιπώδη ιστό (Longnecker et al., 1997). Άλλα εμμένοντα EDCs αποτελούν οι διοξίνες, καθώς και κάποια εντομοκτόνα και παρασιτοκτόνα (Gore et al., 2015).

B) Μη εμμένοντα EDCs (Non persistent EDCs)

Οι χημικές ενώσεις που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία, μπορούν να διασπαστούν εύκολα με τη βοήθεια της ηλιακής ακτινοβολίας, τη δράση μικροοργανισμών ή μέσω χημικής επεξεργασίας. Μέσα στον οργανισμό, μεταβολίζονται με σχετικά γρήγορο ρυθμό από το ήπαρ και αποβάλλονται μέσω του πεπτικού και του ουροποιητικού συστήματος (Kidd et al., 2012). Σε αυτούς τους ενδοκρινικούς διαταράκτες ανήκουν οι φαινόλες, όπως η διφαινόλη Α (BPA), τα parabens, ουσίες με αντιμικροβιακή δράση που χρησιμοποιούνται συχνά σε προϊόντα προσωπικής υγιεινής, και οι φθαλικοί εστέρες που θα αναλυθούν εκτεταμένα στη συνέχεια. Παρά τη γρήγορη διάσπαση και απέκκρισή τους, η συνεχής έκθεση έχει σημαντικές επιδράσεις στην υγεία των ζωικών και ανθρώπινων πληθυσμών, αλλά και στη φυσιολογική λειτουργία του οικοσυστήματος (Diamanti – Kandarakis et al., 2009; Kabir et al., 2015).

Ενδοκρινικοί διαταράκτες που έχουν μελετηθεί ευρέως μέχρι σήμερα είναι: η διεθυλσιλβεστρόλη (DES), οι διοξίνες, άλλοι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες, όπως το DDT και τα πολυχλωριωμένα διφαινυλικά (PCBs), η BPA και οι φθαλικοί εστέρες ή φθαλικά (Hannon and Flaws, 2015). Οι χημικές αυτές ουσίες αποτελούν κοινά συστατικά βιομηχανικών, γεωργικών και φαρμακευτικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται ευρέως στην καθημερινότητά μας και κατασκευάστηκαν από τον άνθρωπο για να βελτιώσουν τον τρόπο ζωής του.

Κάποιες από αυτές χρησιμοποιήθηκαν χωρίς να είναι γνωστές οι πιθανές αρνητικές συνέπειές τους για το περιβάλλον, κάποιες άλλες όμως δημιουργήθηκαν ακριβώς με στόχο την τροποποίηση της φυσιολογίας των οργανισμών. Κλασικό παράδειγμα αποτελούν τα αντισυλληπτικά χάπια τα οποία παρασκευάστηκαν με στόχο τον έλεγχο και την τροποποίηση των ορμονικών επιπέδων στις γυναίκες που θέλουν να αποφύγουν μία ανεπιθύμητη εγκυμοσύνη ή που πάσχουν από κάποια ασθένεια όπως το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS). Το ενεργό συστατικό των περισσότερων αντισυλληπτικών χαπιών, η 17α-αιθινυλοιστραδιόλη (EE2), αποβάλλεται μέσω των ούρων στο αποχετευτικό σύστημα, καταλήγει στο θαλάσσιο οικοσύστημα και έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τους οργανισμούς που ζουν σε αυτό (Sanders and Stouffer, 1997; Peijnenburg and Struijs, 2006; Bhattacharya and Keating, 2012). Άλλα EDCs που συντέθηκαν ώστε να παρεμβαίνουν στη φυσιολογική λειτουργία ενός οργανισμού και να τον καταστρέφουν είναι τα παρασιτοκτόνα και τα ζιζανιοκτόνα (π.χ. DDT, atrazine). Αρχικός τους στόχος ήταν να προστατέψουν τις καλλιέργειες και να αυξήσουν τη γεωργική παραγωγή, όπως ήταν λογικό, όμως, χημικές ουσίες που επηρεάζουν την επιβίωση εντόμων και φυτών, δε θα μπορούσαν να είναι απόλυτα αβλαβείς για τον άνθρωπο. Συνεπώς, ποικίλες αρνητικές επιδράσεις τους, όπως η πρόωρη έναρξη εφηβείας και εμμηνόπαυσης, η μεγαλύτερη διάρκεια του έμμηνου κύκλου κ.ά., έχουν παρατηρηθεί μέχρι σήμερα (Sowers and La Pietra, 1995; Hoyer, 2005; Craig et al., 2011).



Εικόνα 5: Πιθανοί μηχανισμοί δράσης ενδοκρινικών διαταρακτών και ιστοί που επηρεάζονται (Schug et al., 2016)

1.8.1 Μηχανισμοί δράσης ενδοκρινικών διαταρακτών

Λόγω της μεγάλης ποικιλίας που παρουσιάζουν ως προς τη δομή και τις χημικές τους ιδιότητες, είναι αναμενόμενο οι ενδοκρινικοί διαταράκτες να έχουν πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Οι αρχικές υποθέσεις έκαναν λόγο για άμεση πρόσδεσή τους σε υποδοχείς ορμονών όπως οι υποδοχείς οιστρογόνων, ανδρογόνων, προγεστερόνης, ρετινοειδών και άλλων, μέσω των οποίων θα μπορούν είτε να δράσουν αγωνιστικά μιμούμενοι τη δράση των ενδογενών ορμονών και επάγοντας τη σηματοδότηση, είτε να δράσουν ανταγωνιστικά παρεμποδίζοντας την πρόσδεση των ορμονών και, άρα, τη φυσιολογική μετάδοση μηνυμάτων σε κυτταρικό επίπεδο (Kabir et al., 2015).

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια, συνέλεξαν στοιχεία που υποδεικνύουν και άλλους μηχανισμούς δράσης, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται η παρεμβολή των ενδοκρινικών διαταρακτών στη φυσιολογική σύνθεση, αλλά και την απενεργοποίηση των ορμονών και των υποδοχέων τους (Εικόνα 5). Αυτό μπορεί να συμβεί με παρεμπόδιση της γονιδιακής έκφρασης και τροποίηση της λειτουργίας πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη σύνθεση και το μεταβολισμό των μορίων αυτών (National Institute of Environmental Health Sciences, 2010; UNEP and WHO, 2013). Άλλα EDCs μπορούν να εμποδίζουν την έκκριση μίας ορμόνης, αλλά και τη σωστή μεταφορά της στους ιστούς – στόχους (Diamanti – Kandarakis et al., 2009). Όπως είναι λογικό, η παρεμβολή στα επίπεδα και τη σηματοδότηση μέσω των ενδογενών ορμονών, θα παρεμποδίσει και τη φυσιολογική ανατροφοδότηση των συστημάτων του οργανισμού, με αποτέλεσμα την προέκταση των προβλημάτων του ενδοκρινικού συστήματος (Diamanti – Kandarakis et al., 2009).

Τέλος, πολλά πρόσφατα επιστημονικά δεδομένα δείχνουν ότι τα EDCs επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση, όχι μόνο με την πρόκληση μεταλλαγών, αλλά και μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων (Anway et al., 2005; Anway and Skinner, 2006; 2008; Crews and McLachlan, 2006). Οι τροποποιήσεις αυτές έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να μεταβιβάζονται στους απογόνους και να μεταφέρουν τις αρνητικές επιδράσεις των ενδοκρινικών διαταρακτών σε επόμενες γενιές.

Κάποια EDCs φαίνεται να έχουν διαφορετικές δράσεις στον οργανισμό ανάλογα με την ηλικία στην οποία εκτίθεται ένας οργανισμός, αλλά και ανάλογα με τη φύση του χημικού στοιχείου. Για παράδειγμα το DTT φαίνεται να έχει οιστρογονική και αντιανδρογονική δράση, κι αυτό γιατί ενώ η αρχική ένωση αποτελεί αγωνιστή οιστρογόνων, διασπάται μέσα στον οργανισμό σε DDE που δρα ως ανδρογονικός ανταγωνιστής (Rasier et al., 2007).

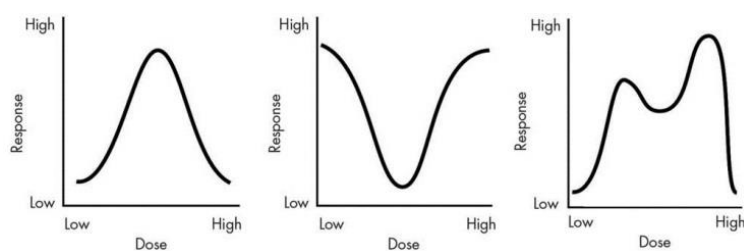
Μη μονοτονική δράση

Τα EDCs παρουσιάζουν, πολλές φορές, μη μονοτονικές καμπύλες όσον αφορά την απάντηση του οργανισμού σε διαφορετικές δόσεις (Εικόνα 6). Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να έχουν παρόμοια δράση σε χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ η δράση αυτή να αντιστρέφεται ή να μειώνεται σε ενδιάμεσες συγκεντρώσεις. Ακόμη, σε κάποιες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί αντίθετη δράση ανάλογα με τη δόση στην οποία εκτίθεται ένας οργανισμός. Έχει δειχθεί, για παράδειγμα, ότι η DES σε χαμηλές

συγκεντρώσεις επάγει τον καρκίνο του προστάτη, ενώ σε μεγάλες φαίνεται να έχει αντίθετα αποτελέσματα (Bern, 1992; vom Saal et al., 1997). Όλα αυτά είχαν πολύ μεγάλη σημασία, εφόσον διαπιστώθηκε ότι η μελέτη υψηλών δόσεων δεν μπορεί να μας οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα για τις χαμηλότερες δόσεις, θεωρώντας πως η σχέση τους είναι πάντα γραμμική (Schug et al., 2012).

Αυτή η μη μονοτονική απάντηση στα EDCs μπορεί να εξηγηθεί εάν αναλογιστούμε ότι οι ενδογενείς ορμόνες, τις οποίες επηρεάζουν ή μιμούνται, παρουσιάζουν επίσης μη μονοτονικό τρόπο δράσης. Μελέτες έχουν προτείνει διάφορους μηχανισμούς για την κατανόηση του μη μονοτονικού τρόπου δράσης. Ένας από αυτούς προτείνει ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις ο ενδοκρινικός διαταράκτης προσδένεται επιλεκτικά μόνο σε ένα είδος υποδοχέα, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, όμως, μπορεί να προσδεθεί μη ειδικά και σε άλλους υποδοχείς. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η BPA η οποία σε χαμηλές συγκεντρώσεις προσδένεται σε υποδοχείς οιστρογόνων (ERs), ενώ σε μεγαλύτερες μπορεί να συνδεθεί και σε υποδοχείς ανδρογόνων (ARs) (Sohoni and Sumpter, 1998; Moriyama et al., 2002; Tilghman et al., 2010).

Σε κάποιες άλλες περιπτώσεις, έχει παρατηρηθεί ότι χαμηλές δόσεις μιας ορμόνης προκαλούν αναστολή της μεταγραφής κάποιων γονιδίων, ενώ υψηλότερες δόσεις επάγουν τη μεταγραφή, με αποτέλεσμα το κύτταρο να ανταποκρίνεται με πολύ διαφορετικό τρόπο σε κάθε περίπτωση. Κάτι τέτοιο έχει παρατηρηθεί στην περίπτωση της οιστραδιόλης και άρα θα μπορούσε να ισχύει και στην περίπτωση των ενδοκρινικών διαταρακτών που τη μιμούνται (Coser et al., 2003). Ένας ακόμη μηχανισμός δράσης είναι και η αποικοδόμηση ή η αποευαισθητοποίηση των υποδοχέων για τον τερματισμό της ορμονικής σηματοδότησης (Ismail and Nawaz, 2005). Αυτό είναι ένα αρκετά σύνθετο φαινόμενο για τους μεμβρανικούς υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCRs), έχει παρατηρηθεί σε υποδοχείς όπως αυτός της FSH, της hCG και των προσταγλανδινών και μπορεί να συμβάλλει στην απόκριση του κυττάρου σε κάποιον ενδοκρινικό διαταράκτη με τη μεταβολή της συγκεντρώσής του (Lohse, 1993; Freedman and Lefkowitz, 1996; Bohm et al., 1997)



Εικόνα 6: Παραδείγματα μη μονοτονικής δράσης (Προσαρμογή από Vandenberg et al., 2012)

Δράση σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις

Εφόσον, όπως ειπώθηκε και προηγουμένως, οι ενδοκρινικοί διαταράκτες επηρεάζουν τη σύνθεση, την απελευθέρωση και το μεταβολισμό των ορμονών ή αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς τους, είναι αναμενόμενο να ασκούν τη δράση τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τις ορμόνες (Welshons et al., 2003).

Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις των ορμονών παρουσιάζουν διακυμάνσεις ανάλογα με την ηλικία του ατόμου αλλά και την κατάσταση της φυσιολογίας του. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η συγκέντρωση των ορμονών του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης – γονάδων στις γυναίκες, μεταξύ των διαφόρων ηλικιών, αλλά και μεταξύ των διαφορετικών σταδίων του έμμηνου κύκλου (Vandenberg et al., 2012). Θα πρέπει, επομένως, σε σχετικές ερευνητικές μελέτες, να λαμβάνεται υπόψη ότι ακόμα και μικρές δόσεις EDCs μπορούν να επηρεάσουν αυτές τις διακυμάνσεις, έχοντας ποικίλες συνέπειες για τον οργανισμό (Welshons et al., 2003; Hayers et al., 2011).

Δύο σημαντικά μεγέθη που χρησιμοποιούνται στις σύγχρονες μελέτες των ενδοκρινικών διαταρακτών είναι το LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) και το NOAEL (No Observed Adverse Effect Level). Το πρώτο περιγράφει τη χαμηλότερη δόση στην οποία έχουν παρατηρηθεί τοξικά αποτελέσματα της μελετούμενης χημικής ένωσης, ενώ το δεύτερο αναφέρεται στην υψηλότερη δόση, στην οποία η ίδια ένωση δεν έχει δείξει καμία αρνητική επίδραση. Με βάση τα δύο αυτά μεγέθη, οι επιστήμονες καθορίζουν τα ασφαλή επίπεδα έκθεσης του ανθρώπου για κάθε ενδοκρινικό διαταράκτη (Gore and Dickerson, 2012).

Περίοδοι έκθεσης και υπερευαισθησίας

Μεταξύ των ερευνητών που ασχολούνται με τις επιδράσεις των EDCs, υπάρχουν κι εκείνοι που δηλώνουν αντίθετοι στον προσδιορισμό «ασφαλούς δόσης». Η άποψή τους βασίζεται στο γεγονός ότι σε κάποια αναπτυξιακά στάδια ο οργανισμός δεν εκτίθεται καθόλου σε συγκεκριμένες ενδογενείς χημικές ενώσεις. Επομένως, ακόμα και έκθεση σε ελάχιστη ποσότητα ενός ενδοκρινικού διαταράκτη, σε αυτά τα αναπτυξιακά στάδια, μπορεί να επηρεάσει τις φυσιολογικές διεργασίες των κυττάρων βραχυπρόθεσμα αλλά και μακροπρόθεσμα (Seehan, 2006; Vandenberg et al., 2012).

Ανάλογα με το πότε εκτίθεται ένας οργανισμός, τη φύση του διαταράκτη και τα επίπεδά του, οι αρνητικές επιδράσεις μπορεί να γίνονται εμφανείς κατά τη γέννηση ή σε πολύ μετέπειτα στάδια της ζωής. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι στους ενήλικες προκαλείται τοξικότητα μετά από έκθεση σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις EDCs και η επίδραση διαρκεί όσο και η έκθεση. Αντιθέτως, η επίδραση χαμηλότερης δόσης σε μία ευαίσθητη αναπτυξιακή περίοδο μπορεί να έχει σοβαρότερα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα στον οργανισμό (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Schug et al., 2011).

Αυτό το φαινόμενο αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως DOHaD (developmental origins of health and disease) και αφορά την ενδομήτρια ανάπτυξη και τη μεταγεννητική περίοδο οπότε πολλά συστήματα του οργανισμού συνεχίζουν να διαμορφώνονται (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Gore et al., 2015). Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια, πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν ως στόχο τους την κατανόηση της επίδρασης των EDCs όχι μόνο στα άτομα που εκτίθενται, αλλά και στις μετέπειτα γενιές κι αυτό, γιατί φαίνεται να προκαλούν μη γενωμικές τροποποιήσεις στα γαμετικά κύτταρα, όπως μεθυλίωση του DNA και ακετυλίωση των ιστονών (Schug et al., 2011).

1.9 ΦΘΑΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι φθαλικές ενώσεις ανήκουν στους πιο κοινούς πλαστικοποιητές, είναι δηλαδή τεχνητές χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή πλαστικών καθώς τους προσφέρουν ευκαμψία και ανθεκτικότητα. Συναντώνται πολύ συχνά σε κοινά καταναλωτικά προϊόντα, όπως πλαστικές συσκευασίες τροφίμων, μπουκάλια νερού, παιδικά παιχνίδια, σε ιατρικά και φαρμακευτικά προϊόντα, όπως συμπληρώματα διατροφής και χειρουργικά γάντια, σε οικοδομικά υλικά, αλλά και προϊόντα υγιεινής και ομορφιάς, όπως σπρέυ μαλλιών και κολώνιες. Οι χημικές αυτές ενώσεις βρίσκονται μη ομοιοπολικά δεσμευμένες στο πλαστικό, με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται εύκολα στον αέρα, στα υγρά και τα τρόφιμα, από όπου μπορούν εύκολα να εισέλθουν στον οργανισμό μέσω κατάποσης, εισπνοής και απορρόφησης από το δέρμα. Γίνεται επομένως φανερό, ότι η έκθεση του ανθρώπου γίνεται σε καθημερινή βάση και περιλαμβάνει όλα τα στάδια της ζωής του από τη βρεφική, ακόμα, ηλικία (Hannon and Flaws, 2015).

Οι φθαλικές ενώσεις προκύπτουν έπειτα από εστεροποίηση του φθαλικού οξέος με διαφορετικές αλκοόλες. Είναι άχρωμες, άοσμες, έχουν υψηλές λιποφιλικές ιδιότητες και χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, ενώ έχει παρατηρηθεί πως είναι αρκετά σταθερές ενώσεις με αποτέλεσμα να διαλύονται με πολύ αργό ρυθμό στον αέρα και το έδαφος (Hannon and Flaws, 2015). Συνήθως ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες (Ventrice et al., 2013):

α) Φθαλικά υψηλού μοριακού βάρους (DINP, DIDP): αποτελούν το 80% των φθαλικών που χρησιμοποιούνται στην Ευρώπη και δεν είναι τοξικά για τον άνθρωπο.

β) Φθαλικά χαμηλού μοριακού βάρους (DEHP, DBP, BBzP): περιλαμβάνονται στο REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemical substances) και χαρακτηρίζονται ως πολύ επικίνδυνα για την υγεία.

Αφού εισέλθουν στον οργανισμό, οι φθαλικοί διεστέρες μεταβολίζονται στο πεπτικό και το κυκλοφορικό σύστημα από εστεράσες και λιπάσες. Δίνουν μονοεστέρες οι οποίοι στη συνέχεια μπορούν να μεταβολιστούν περαιτέρω, ανάλογα με το μέγεθός τους και το είδος του οργανισμού στον οποίο βρίσκονται, με αποτέλεσμα την εύκολη αποβολή τους στα ούρα (Ventrice et al., 2013; Hannon and Flaws, 2015). Παρότι το πρώτο βήμα της διαδικασίας αυτής έχει ως στόχο την αποτοξίνωση της χημικής ένωσης, στην προκειμένη περίπτωση η μετατροπή σε μονοεστέρες καθιστά τα φθαλικά ακόμα πιο δραστικά και τοξικά για τον οργανισμό (Ventrice et al., 2013). Οι μονοεστέρες, είναι εκείνοι που χρησιμοποιούνται, πέρα από τις αρχικές φθαλικές ενώσεις, ως βιοδείκτες για τη μέτρηση των επιπέδων έκθεσης του ανθρώπου (Koch and Calafat, 2009; Wittassek et al., 2011).

Η πιο κοινή τακτική για τον προσδιορισμό της ανθρώπινης έκθεσης στα φθαλικά, είναι η μέτρηση των μεταβολιτών τους στα ούρα. Παρόλα αυτά οι φθαλικοί εστέρες μπορούν να εντοπιστούν και στον ορό του αίματος, σε δείγματα αμνιωτικού υγρού, ομφαλοπλακουντιακού αίματος, μητρικού γάλακτος, ακόμα και ενδοωοθηκικού υγρού (Becker et al., 2004; Silva et al., 2004; Marsee et al., 2006; Hogberg et al., 2008; Heudorf et al., 2007; Krotz et al., 2012).

1.10 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΣΤΗΝ ΩΟΘΗΚΗ

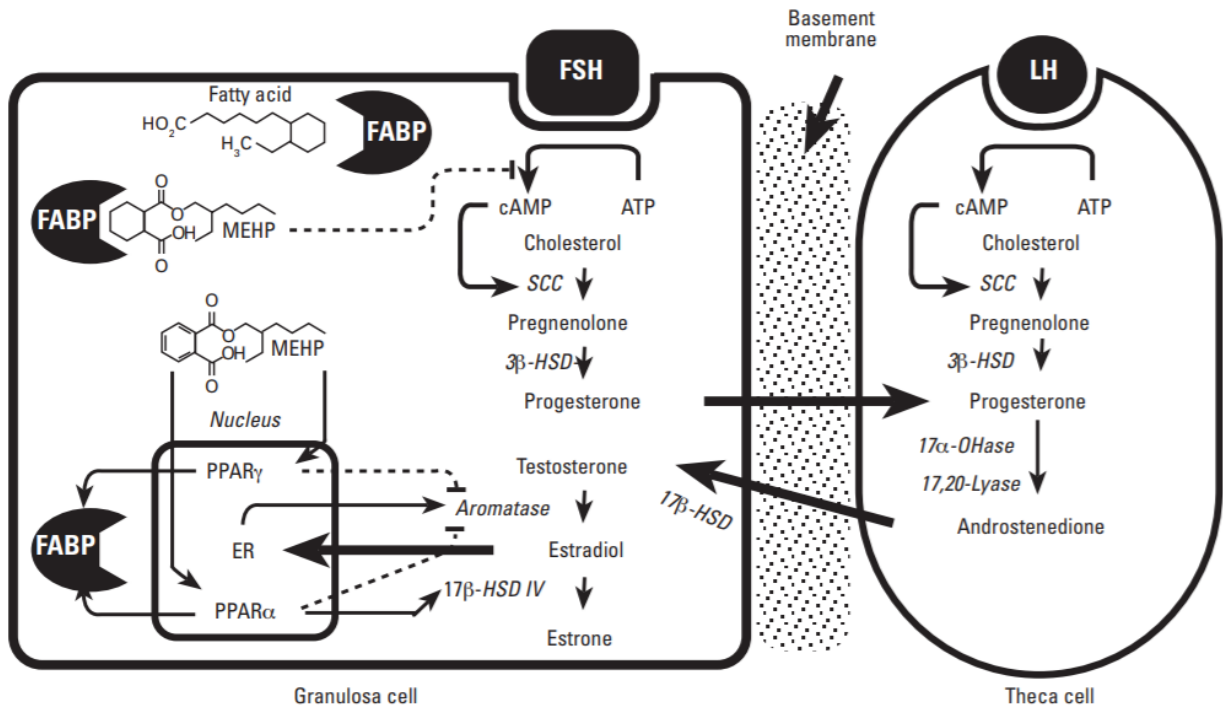
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο άνθρωπος εκτίθεται καθημερινά σε μεγάλη ποικιλία τοξικών ουσιών οι οποίες φαίνεται πως επηρεάζουν σημαντικά την ομοιόσταση του οργανισμού. Η έκθεση σε αυτές τις ουσίες ξεκινάει από την ενδομήτρια ανάπτυξη και συνεχίζεται σε όλη τη διάρκεια της ζωής. Η επίδραση των ενδοκρινικών διαταρακτών γενικότερα, αλλά και πιο συγκεκριμένα των φθαλικών ενώσεων, είναι ένα ζήτημα που έχει απασχολήσει εκτενώς την επιστημονική κοινότητα τις τελευταίες δεκαετίες. Οι περισσότερες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί αφορούν κυρίως τη μελέτη μεμονωμένων χημικών ενώσεων, παρόλα αυτά τα τελευταία χρόνια έχει γίνει εμφανής η ανάγκη μελέτης σύνθετων μειγμάτων που θα αντικατοπτρίζουν καλύτερα τον καθημερινό τρόπο έκθεσης του ανθρώπου.

Επιπλέον, παρότι οι περισσότερες ερευνητικές εργασίες περιορίζονταν στη μελέτη του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος, ολοένα και περισσότεροι ερευνητές έχουν στρέψει, πλέον, το ενδιαφέρον τους στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα και κυρίως στην ωοθήκη. Αυτό συνέβη γιατί πολλά δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι γυναίκες εκτίθενται περισσότερο στις φθαλικές ενώσεις μέσω των πολυάριθμων προϊόντων περιποίησης που χρησιμοποιούν. Ακόμη, οι γυναίκες στη σημερινή εποχή αποφασίζουν να αποκτήσουν παιδιά σε μεγαλύτερη ηλικία από ότι συνέβαινε στο παρελθόν, με αποτέλεσμα η περίοδος έκθεσης να είναι πιο εκτεταμένη από ότι άλλοτε. Στη συνέχεια παρατίθενται δεδομένα από πειραματικές μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα για την επίδραση των φθαλικών ενώσεων κυρίως στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα και αφορούν είτε μεμονωμένα χημικά συστατικά, είτε μίγματα.

1.10.1 Μελέτες μεμονωμένων φθαλικών εστέρων σε πειραματόζωα

DEHP

Το DEHP (di-2-ethylhexyl phthalate) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη φθαλική ένωση στην κατασκευή πλαστικών αντικειμένων, λόγω των χημικών ιδιοτήτων της και του χαμηλού κόστους παραγωγής. Το DEHP, αφού εισέλθει στο σώμα, μεταβολίζεται σε MEHP (monoethylhexyl phthalate) κι αυτό με τη σειρά του διασπάται σε απλούστερες χημικές ενώσεις με διαφορετικό χρόνο ημιζωής μέσα στον οργανισμό (Schmid and Schlatter, 1985). Λόγω της εκτεταμένης χρήσης του, το DEHP αλλά και το MEHP (που χρησιμοποιείται συχνά ως βιοδείκτης) έχουν μελετηθεί περισσότερο από κάθε άλλο φθαλικό εστέρα, σε πολυάριθμα οργανισμικά συστήματα με τη χρήση πολλών διαφορετικών πειραματικών μοντέλων (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Πιθανοί μηχανισμοί δράσης του MEHP στα κοκκιώδη κύτταρα της ωθήκης (Latini et al., 2008)

In utero έκθεση

Από τις πολυάριθμες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα για την κατανόηση του τρόπου δράσης του DEHP, αρκετές έχουν επικεντρωθεί στην ανάπτυξη και τη λειτουργία του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος.

Έκθεση θηλυκών μυών σε DEHP ή MEHP κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης έχει δείξει ότι επηρεάζει την έναρξη της εφηβείας στους απογόνους, αλλά και τη φυσιολογική διάρκεια των φάσεων του οιστρικού κύκλου (Moyer and Hixon, 2012). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί χαμηλότερο βάρος σώματος και αυξημένος λόγος αρσενικών/θηλυκών στην F1 γενιά (Pocard et al., 2012; Niermann et al., 2015).

Όσον αφορά το κύριο αναπαραγωγικό όργανο των θηλυκών θηλαστικών, την ωοθήκη, *in utero* έκθεση μυών έχει δείξει σημαντική επίδραση στη μορφολογία καθώς και τη λειτουργία της. Όσον αφορά την ωοθυλακική ανάπτυξη, πολλές μελέτες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το DEHP επάγει την πρόωρη στρατολόγηση των αρχέγονων ωοθυλακίων, με αποτέλεσμα να παρατηρείται αυξημένος αριθμός προ-κοιλωματικών και κοιλωματικών ωοθυλακίων, σε σχέση με ζώα αντίστοιχης ηλικίας που δεν είχαν εκτεθεί σε DEHP (Moyer and Hixon, 2012; Niermann et al., 2015; Zhang et al., 2015). Μάλιστα, κάποιες από τις δόσεις DEHP που ελέγχθηκαν, βρίσκονται εντός του εύρους συγκεντρώσεων στις οποίες εκτίθεται ο άνθρωπος καθημερινά. Επιπλέον, τα ευρήματα αυτά δεν περιορίστηκαν μόνο στην F1 γενιά, αλλά παρατηρήθηκαν και σε επόμενες γενιές (F2 και F3) που μελετήθηκαν (Pocard et al., 2017).

In utero έκθεση φαίνεται επίσης να επηρεάζει τη φυσιολογική ανάπτυξη των ίδιων των γαμετικών κυττάρων: Δύο ξεχωριστές μελέτες έδειξαν ότι μετά από έκθεση σε DEHP, τα ωοκύτταρα της νεογνικής ωοθήκης καθυστερούν να εισέλθουν στην πρώτη μειωτική διαίρεση (Zhang et al., 2015), ενώ σε μετέπειτα στάδιο της ανάπτυξης του αναπαραγωγικού συστήματος, μικρότερο ποσοστό των ωοκυττάρων φτάνει τελικά στο στάδιο της μείωσης II (Pocard et al., 2012). Οι παραπάνω αλλαγές φαίνεται να οφείλονται σε τροποποίηση της φυσιολογικής έκφρασης γονιδίων που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και την ωρίμανση των ωοκυττάρων, είτε λόγω διαφορικής μεθυλίωσης είτε λόγω κάποιου άλλου μηχανισμού (Zhang et al., 2015).

Μεταξύ των γονιδίων που επηρεάζονται έπειτα από *in utero* έκθεση σε DEHP ή MEHP, βρίσκονται κάποια που κωδικοποιούν ένζυμα της στεροειδογένεσης, αλλά και γονίδια υποδοχέων σημαντικών ορμονών για τη λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος. Πιο αναλυτικά, πειράματα από την Pocard και τους συνεργάτες της έδειξαν ότι έκθεση κατά τη νεογνική ηλικία, μειώνει την έκφραση στεροειδικών ενζύμων όπως τα CYP19a1 και CYP17a1, καθώς και γονίδια υποδοχέων ορμονών, όπως αυτών της FSH, της LH και της προγεστερόνης (Pocard et al., 2012; 2017). Παρόμοια αποτελέσματα προήλθαν και από τις μελέτες άλλων ερευνητικών ομάδων, οι οποίες έδειξαν επιπλέον μείωση του στεροειδικού ενζύμου StAR αλλά και του υποδοχέα οιστρογόνων ERα (Moyer and Hixon, 2012; Zhang et al., 2015). Οι αλλαγές αυτές, όπως είναι αναμενόμενο, τροποποιούν τα επίπεδα στεροειδών ορμονών στον οργανισμό, όπως είναι για παράδειγμα η οιστραδιόλη και επηρεάζουν τελικά, την επικοινωνία μεταξύ υποθαλάμου – υπόφυσης και ωοθήκης.

Μεταγεννητική έκθεση και *in vitro* πειράματα

Εκτός από τις μελέτες που αφορούν την έμμεση έκθεση των μυών σε DEHP, μέσω του πλακούντα κατά τη νεογνική ηλικία και μέσω του μητρικού γάλακτος κατά την πρώιμη μεταγεννητική περίοδο, άλλες ερευνητικές εργασίες ασχολήθηκαν με την άμεση έκθεση μυών σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης, ενώ κάποιες χρησιμοποίησαν *in vitro* συστήματα για την πιο στοχευμένη παρατήρηση ωοκυττάρων, ωοθυλακίων ή ολόκληρων ωοθηκών. Οι μελέτες αυτές, επιβεβαιώνουν τις έρευνες που αναφέρθηκαν προηγουμένως αλλά προσφέρουν και επιπρόσθετα σημαντικά δεδομένα.

Πιο συγκεκριμένα, έκθεση σε DEHP μετά από ένεση σε νεογέννητους μύες ή απευθείας έγχυση σε καλλιέργειες ωοθηκών, καθυστερεί τη διάσπαση των φωλεών γαμετικών κυττάρων με αποτέλεσμα να μειώνεται ο ρυθμός δημιουργίας αρχέγονων ωοθυλακίων. Αυτό οφείλεται σε μη σωστή σηματοδότηση που διαμεσολαβείται από τους υποδοχείς οιστρογόνων (ERα και ERβ), σε διαφορετική μεθυλίωση γονιδίων και μειωμένο πολλαπλασιασμό των πρόδρομων κοκκιωδών κυττάρων (Zhang et al., 2014; Mu et al., 2015). Από την άλλη, έκθεση μυών κατά την προεφηβεία, είχε και πάλι ως αποτέλεσμα τη μείωση των αρχέγονων ωοθυλακίων, στην ηλικία αυτή όμως κάτι τέτοιο φαίνεται να προκαλείται από την αυξημένη στρατολόγησή τους (Zhang et al., 2013; Hannon et al., 2014).

Επιπλέον δεδομένα από έκθεση νεογέννητων μυών σε DEHP υποστηρίζουν ότι ο φθαλικός εστέρας προκαλεί μείωση των κοιλωματικών ωοθυλακίων στην προεφηβική ωοθήκη (PND20), κάτι που θα επηρεάσει στη συνέχεια την αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών. Οι ερευνητές που πραγματοποίησαν το παραπάνω πείραμα, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μείωση του αριθμού των ωοθυλακίων προχωρημένου αναπτυξιακού σταδίου, προκαλείται από συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), αύξηση έκφρασης προαποπτωτικών γονιδίων, αλλά και γονιδίων που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο (Li et al., 2016).

Παρόμοιες παρατηρήσεις προκύπτουν και από πειράματα *in vitro* όπου έκθεση σε DEHP ή MEHP παρεμποδίζει τη φυσιολογική ωρίμανση και επιβίωση ωοκυττάρων και ωοθυλακίων, λόγω αναστολής ενζύμων με αντιοξειδωτική δράση και αύξηση του οξειδωτικού στρες (Dalman et al., 2008; Bonilla and Del, 2010; Gupta et al., 2010; Wang et al., 2012a,b). Επιπροσθέτως, *in vitro* δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι φθαλικοί εστέρες παρεμποδίζουν την κυτταρική ωρίμανση και πολλαπλασιασμό επηρεάζοντας την έκφραση διαφόρων κυκλινών (Craig et al., 2013), μειώνοντας την έκφραση γονιδίων της στεροειδογένεσης, αυξάνοντας τα επίπεδα προαποπτωτικών και μειώνοντας τα επίπεδα αντιαποπτωτικών μορίων (Gupta et al., 2010; Wang et al., 2012; Craig et al., 2014).

Βλέπουμε, επομένως, ότι δεδομένα από πολυάριθμες μελέτες υποδεικνύουν ότι έκθεση σε DEHP και MEHP επηρεάζουν σημαντικά τη μορφολογία και λειτουργία της ωοθήκης οδηγώντας σε πρόωρη ανάπτυξή της, μείωση της αναπαραγωγικής ζωής και πρόκληση υπογονιμότητας.

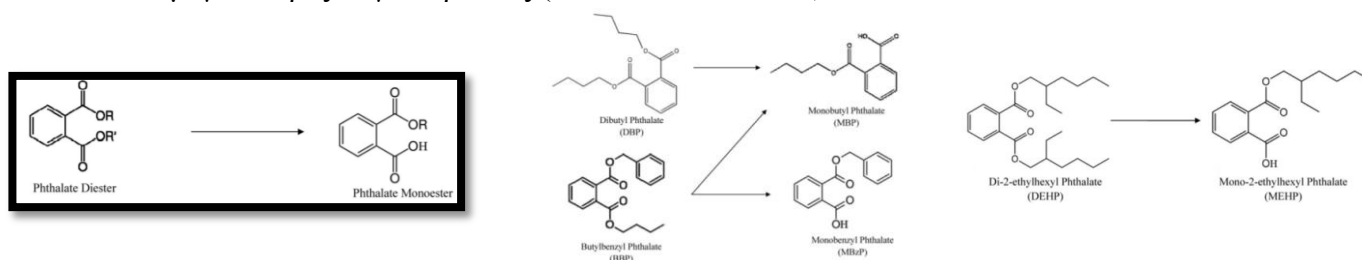
DBP

Το DBP (dibutyl phthalate) συναντάται συχνά ως διαλύτης σε διάφορα υλικά όπως χρωστικές και λούστρα, σε βερνίκια νυχιών και άλλα προϊόντα περιποίησης, καθώς και ως βασικό συστατικό επικάλυψης φαρμακευτικών προϊόντων όπως τα χάπια (Craig et al., 2013). Ως βιοδείκτης του χρησιμοποιείται συνήθως το MBP (monobutyl phthalate) (Εικόνα 8).

Πειράματα έκθεσης σε DBP κατά την προγεννητική και πρώιμη μεταγεννητική περίοδο, αφορούν κυρίως αρσενικούς επίμυες και έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση αρκετά μεγάλων δόσεων. Αποτελέσματα των μελετών αυτών υποδεικνύουν ότι το DBP προκαλεί αναπτυξιακές και αναπαραγωγικές διαταραχές στα αρσενικά και πιο συγκεκριμένα ότι μειώνει την έκφραση ενζύμων της στεροειδογένεσης με αποτέλεσμα να επηρεάζονται τα φυσιολογικά επίπεδα ορμονών στον οργανισμό (Lehman et al., 2004; Thompson et al., 2004; Giribabu et al., 2012).

Αντίστοιχες μελέτες σε θηλυκά πειραματόζωα είναι λιγότερες και αφορούν κυρίως επίμυες. Οι μελέτες αυτές έχουν συσχετίσει την έκθεση σε DBP με αποβολές, μειωμένο βάρος ωοθηκών και μήτρας, δυσμορφίες του αναπαραγωγικού συστήματος και καθυστερημένη έναρξη του οιστρικού κύκλου (Ema et al., 2000; Salazar et al., 2004; Lee et al., 2006; Kay et al., 2013). Όσον αφορά τους μυς, πειραματική μελέτη από τη Sen και τους συνεργάτες της υποδηλώνει ότι υψηλές, αλλά και χαμηλές συγκεντρώσεις DBP προκαλούν αύξηση της έκφρασης προαποπρωτικών γονιδίων καθώς και γονιδίων της στεροειδογένεσης (*Hsd17b1*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1*) (Sen et al., 2015). Μάλιστα τα επίπεδα έκθεσης σε αυτήν την έρευνα προσομοίαζαν τα επίπεδα έκθεσης του ανθρώπου.

Άλλα δεδομένα για την επίδραση του DBP στον οργανισμό προέρχονται από πειράματα *in vitro*. Συγκεκριμένα, *in vitro* έκθεση ωοθυλακίων με άντρο, είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή προαποπρωτικών γονιδίων, αναστολή αντιαποπρωτικών γονιδίων και μείωση των επιπέδων κυκλινών όπως η D2. Τα κοιλωματικά ωοθυλάκια που εκτέθηκαν στη μεγαλύτερη δόση παρουσίασαν περιορισμένο ανάπτυξη, ενώ όλα τα ωοθυλάκια εμφάνισαν μειωμένη παραγωγή E2 και αυξημένη ατρησία μετά από παρατεταμένη έκθεση στο φθαλικό εστέρα (Zelieann et al., 2013). Μία σημαντική παρατήρηση στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν ότι η έκφραση των γονιδίων επηρεαζόταν ακόμα και στα ωοθυλάκια εκείνα που αναπτύσσονται φυσιολογικά. Αυτό υποδεικνύει ότι σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις του DBP τα ωοθυλάκια κατάφερναν να αποφύγουν την παύση του κυτταρικού κύκλου που προκαλούνταν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (Zelieann et al., 2013).



Εικόνα 8: Κοινώς χρησιμοποιούμενοι φθαλικοί εστέρες (DBP, BzBP, DEHP) και οι βασικοί τους μεταβολίτες (Kay et al., 2013)

BBzP

Το BBzP (benzylbutyl phthalate) είναι ένας φθαλικός εστέρας που συναντάται συνήθως σε υλικά επίστρωσης δαπέδων, σε συγκολλητικές ουσίες, αλλά και σε προϊόντα που κατασκευάζονται από συνθετικό δέρμα. Κύριο μεταβολίτη του αποτελεί το MBzP (mono-benzyl phthalate) (Kavlock et al., 2002).

Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν το BBzP έχουν πραγματοποιηθεί σε επίμυες και δίνουν ποικίλα αποτελέσματα ανάλογα με τον τρόπο και το χρόνο έκθεσης, καθώς και τη δόση που μελετάται κάθε φορά. Αποτελέσματα από *in utero* έκθεση παρουσιάζουν στους θηλυκούς απογόνους της F1 μία καθυστέρηση έναρξης της εφηβείας σε αυξημένες συγκεντρώσεις του φθαλικού, μαζί με αλλαγές στην κυτταροαρχιτεκτονική και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μαστού (Tyl et al., 2004; Moral et al., 2004). Άλλες μελέτες, παρ'όλα αυτά, δείχνουν επιτάχυνση (Ashby et al., 1997) ή ακόμη και καμία επίδραση της φθαλικής ένωσης στην ηλικία διάνοιξης του κόλπου (Nagao et al., 2000; Aso et al., 2005). Επιπλέον, το BBzP σε μεγάλες συγκεντρώσεις φάνηκε να μειώνει το βάρος σώματος των θηλυκών απογόνων, να αυξάνει την πρωκτογεννητική απόσταση (AGD) και να μειώνει το βάρος των ωοθηκών (Nagao et al., 2000). Επιπρόσθετα, *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι το BBzP έχει ελαφριά οιστρογονική δράση και μπορεί να επηρεάζει άμεσα την εμβρυική ανάπτυξη και επιβίωση, μειώνοντάς τη σημαντικά (Saillenfait et al., 2003).

DINP

Το DINP (diisononyl phthalate) χρησιμοποιείται για την κατασκευή διαφόρων προϊόντων καθημερινής χρήσης όπως παιχνίδια, καλαμάκια, λάστιχα κηπουρικής, γάντια κ.ά. Χρησιμοποιείται επίσης στην κατασκευή PVC δαπέδων και στρωμάτων ύπνου, με αποτέλεσμα να συναντάται συχνά ως συστατικό της οικιακής σκόνης (Larsson et al., 2017). Τελευταία, έχει αντικαταστήσει το DEHP στην κατασκευή πλαστικών προϊόντων με αποτέλεσμα να αυξηθούν οι ερευνητικές εργασίες για την εξακρίβωση της ασφάλειάς του.

Μελέτες για την *in utero* δράση του DINP σε μυς, δείχνουν μείωση του μέσου βάρους των απογόνων ακόμα και σε χαμηλές δόσεις, ενώ τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από αντίστοιχα πειράματα σε επίμυες (Masutomi et al., 2003; ECHA, 2013). Επιπλέον δεδομένα από μελέτες επίμυων, έχουν συσχετίσει αυξημένες συγκεντρώσεις DINP με αυξημένο AGD, μειωμένο βάρος ωοθηκών και μειωμένο αριθμό ωχρών σωματίων στους θηλυκούς απογόνους, ενώ δε φαίνεται να επηρεάζει την ημέρα διάνοιξης του κόλπου και το φυσιολογικό οιστρικό κύκλο (Masutomi et al., 2003; ECHA, 2010).

Τέλος, πιο πρόσφατες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει ως πειραματικό μοντέλο το ψάρι *Danio reiro* (zebrafish), καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι το DINP συντελεί στην εμφάνιση μειωμένης γονιμότητας, τροποποιεί τη φυσιολογική μορφολογία της ωοθήκης και επηρεάζει σημαντικά την έκφραση γονιδίων όπως τα *star*, *cyp11*, *Fshr*, *Lhcgr*, *Era* και *Erb*. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σημαντικά καθώς το zebrafish φαίνεται να έχει παρόμοια απόκριση με τα θηλαστικά σε χημικά στοιχεία, όπως φάρμακα και τοξικές ουσίες του περιβάλλοντος (Santangeli et al., 2017).

1.10.2 Μελέτες μειγμάτων φθαλικών εστέρων σε πειραματόζωα

Παρά τα πολυάριθμα στοιχεία που έχουν συλλεχθεί μέχρι σήμερα από μελέτες μεμονωμένων φθαλικών εστέρων, λίγες είναι οι ερευνητικές εργασίες που έχουν ασχοληθεί με την επίδραση μειγμάτων φθαλικών ενώσεων στον οργανισμό και συγκεκριμένα στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα. Οι μελέτες μειγμάτων έχουν τεράστια σημασία καθώς μπορούν να μας προσφέρουν ακόμη πιο χρήσιμες πληροφορίες για τον αντίκτυπο της πραγματικής έκθεσης του ανθρώπου σε πολυάριθμες τοξικές ουσίες του περιβάλλοντος.

Οι πιο σημαντικές μελέτες, για την επίδραση μειγμάτων φθαλικών εστέρων στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα, έχουν πραγματοποιηθεί από τη Zhou και συνεργάτες (Zhou et al., 2017a; 2017b). Στις μελέτες αυτές εξετάστηκαν οι επιπτώσεις της ενδομήτριας έκθεσης μυών σε μίγμα φθαλικών ενώσεων (DEP, DEHP, DBP, DINP, DIBP, BBzP), όχι μόνο στους θηλυκούς απογόνους της F1 γενιάς, αλλά και στους απογόνους της F2 και F3 γενιάς. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν βασίστηκαν σε δεδομένα που προήλθαν από έγκυες γυναίκες και, άρα, προσομοιάζουν τα επίπεδα έκθεσης του ανθρώπου.

Πιο αναλυτικά, οι απόγονοι της F1 γενιάς φάνηκε να εμφανίζουν μειωμένο AGD, αυξημένο βάρος μήτρας, διαταραχές του οιστρικού κύκλου, μειωμένη γονιμότητα και εμφάνιση κύστεων στις ενήλικες ωοθήκες. Η ημέρα διάνοιξης του κόλπου, καθώς και το βάρος των ωοθηκών τις μεταγεννητικές μέρες 21 και 90 δε φάνηκε να επηρεάζονται (Zhou et al., 2017a). Επιπλέον, οι μελέτες που έγιναν στις επόμενες γενιές έδειξαν επίσης αύξηση του βάρους της μήτρας, διαφοροποίηση του AGD και προβλήματα γονιμότητας, μεταξύ άλλων, υποδεικνύοντας ότι προγεννητική έκθεση σε φθαλικά μίγματα επηρεάζει την αναπαραγωγική ικανότητα ακόμα και σε επόμενες γενιές (Zhou et al., 2017b).

In vitro πειράματα από την ίδια ερευνητική ομάδα εξέτασαν την επίδραση του φθαλικού μίγματος απευθείας στα κοιλωματικά ωοθυλάκια (Zhou et al., 2017c). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, οι φθαλικοί εστέρες τροποποιούν την έκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο, όπως η κυκλίνη D2 και παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των σωματικών κυττάρων του ωοθυλακίου, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η ανάπτυξή του. Επιπλέον, το μίγμα τροποίησε την έκφραση των υποδοχέων ERα και FSHR, επηρεάζοντας τη φυσιολογική σηματοδότηση μεταξύ των ωοθυλακικών κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα προκάλεσε μείωση της παραγόμενης ανδροστενεδιόνης, τεστοστερόνης, οιστρονής και οιστραδιόλης λόγω εμπλοκής στο μονοπάτι της στεροειδογένεσης. Τέλος, τα αποτελέσματά τους έδειξαν πως η έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων μειωνόταν, κάτι που πιθανώς προκαλεί αύξηση του οξειδωτικού στρες στα ωοθυλάκια προχωρημένου σταδίου ανάπτυξης.

1.10.3 Επιδημιολογικές μελέτες στον άνθρωπο

Οι επιδημιολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα με θέμα τη δράση των φθαλικών ενώσεων στον άνθρωπο, είναι λιγιστές. Οι περισσότερες από αυτές, έχουν επικεντρωθεί στο αρσενικό ενδοκρινικό και αναπαραγωγικό σύστημα, παρότι πολλά στοιχεία δείχνουν ότι η καθημερινή έκθεση των γυναικών είναι αρκετά μεγαλύτερη (Hannon and Flaws, 2015). Όσον αφορά τα παιδιά, η έκθεση στα φθαλικά φαίνεται να διαφέρει σημαντικά από τους ενήλικες, πράγμα αναμενόμενο εάν λάβουμε υπόψη το πολύ μικρότερο βάρος σώματος (Koch et al., 2004a; 2004b; Silva et al., 2004a; 2004b). Επιπλέον, νεογνά που περνούν τις πρώτες ημέρες της ζωής τους στις μονάδες εντατικής νοσηλείας έχουν μεγαλύτερα επίπεδα έκθεσης σε φθαλικά, κυρίως DEHP, λόγω της συνεχούς επαφής τους με πολλές ιατρικές συσκευές και εργαλεία (Green et al., 2005). Γενικά, ο τρόπος και τα επίπεδα της έκθεσης εξαρτώνται συχνά από την ηλικία, το επάγγελμα, τη γεωγραφική περιοχή στην οποία δραστηριοποιείται ένα άτομο και πολλούς ακόμη παράγοντες.

Οι πρώτες μελέτες, οι οποίες έλαβαν χώρα στις ΗΠΑ, περιελάμβαναν ζεύγη μητέρων και γιων και έδειξαν ότι η έκθεση της μητέρας σε χημικές ενώσεις όπως το DEHP, επηρεάζει, και συγκεκριμένα μειώνει, το AGD και το μέγεθος των αναπαραγωγικών οργάνων στους αρσενικούς απογόνους (Swan et al., 2005; Swan 2008). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε αντίστοιχες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο Μεξικό και την Ιαπωνία (Bustamante-Montes et al., 2013; Suzuki et al., 2012), ενώ σε μία πρόσφατη Σουηδική μελέτη βρέθηκε ότι και το DINP, που σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιείται ως αντικαταστάτης του DEHP, σχετίζεται με μειωμένο AGD σε άνδρες (Bornehag et al., 2014).

Παρόλα αυτά, υπάρχουν επιδημιολογικές έρευνες που αντικρούουν τις παραπάνω παρατηρήσεις. Ένα παράδειγμα αποτελεί μία Δανέζικη έρευνα στην οποία δε βρέθηκε καμία συσχέτιση των επιπέδων των φθαλικών εστέρων στις μητέρες και του AGD ή του μεγέθους των αναπαραγωγικών οργάνων των αρσενικών απογόνων. Αξίζει να αναφερθεί εδώ, ότι τα επίπεδα των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων που μετρήθηκαν στα ούρα των εγκύων στη Δανία ήταν αρκετά χαμηλότερα από εκείνα της Σουηδικής μελέτης που προαναφέρθηκε και πιθανώς σε αυτό να οφείλονται τα αντικρουόμενα αποτελέσματα (Kold Jensen et al., 2016).

Όσον αφορά την επίδραση των φθαλικών στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, οι παρατηρήσεις που έχουν γίνει από διάφορες επιστημονικές ομάδες είναι ακόμα πιο αντιφατικές. Έρευνες σε κορίτσια εφηβικής ηλικίας υποστηρίζουν ότι υψηλές συγκεντρώσεις φθαλικών εστέρων συσχετίζονται με πρόωμη θηλαρχή (Chou et al., 2009; Colon et al., 2000). Αντιθέτως, αποτελέσματα από έρευνες με περισσότερους συμμετέχοντες δεν επιβεβαιώνουν την προαναφερθείσα συσχέτιση, ενώ ταυτόχρονα υποστηρίζουν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ φθαλικών ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους και καθυστέρησης εμφάνισης τριχοφυΐας στην περιοχή των γεννητικών οργάνων (Wolff et al., 2010; Frederiksen et al., 2012). Η παρατήρηση αυτή μπορεί να εξηγηθεί εάν αναλογιστούμε την αντι-ανδρογονική δράση που φαίνεται να έχουν οι φθαλικοί εστέρες και οι μεταβολίτες τους.

Συνάμα, λιγοστές είναι οι μελέτες που εξετάζουν την επίδραση των φθαλικών στη γονιμότητα, με κάποιες από αυτές να προτείνουν ότι η αυξημένη έκθεση συνδέεται με αυξημένη πιθανότητα αυτόματης αποβολής (Tabacova et al., 1999; Toft et al., 2012). Επιπρόσθετα, άλλες έρευνες υποδεικνύουν μία συσχέτιση μεταξύ αυξημένης συγκέντρωσης φθαλικών στα ούρα των εγκύων και εγκυμοσύνη αυξημένης διάρκειας (Latini et al., 2003; Wolff et al., 2008; Adibi et al., 2009), τα αποτελέσματα, όμως, αυτά τροποποιούνται ανάλογα με τον αποκλεισμό ή όχι των εξαιρετικά πρόωρων γεννήσεων (Key et al., 2013). Εάν, λοιπόν, ληφθούν υπόψη όλες οι έρευνες που έχουν ασχοληθεί με την επίτευξη μιας εγκυμοσύνης, τη γέννηση και το βάρος σώματος των απογόνων, φαίνεται τελικά να υποστηρίζεται μία συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης της μητέρας στα φθαλικά και την πρόωρη γέννηση (Key et al., 2013).

Ένας ακόμη παράγοντας που έχει εξετασθεί σε αντίστοιχες μελέτες και αφορά το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα είναι η ενδομητρίωση, μία ασθένεια που συνδέεται με τα επίπεδα των οιστρογόνων και χαρακτηρίζεται από ανάπτυξη ενδομήτριου ιστού σε οποιοδήποτε μέρος του σώματος εκτός της μητρικής κοιλότητας. Δεδομένα από διαφορετικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η αυξημένη συγκέντρωση φθαλικών συντελεί σε αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης ενδομητρίωσης (Cobellis et al., 2003; Reddy et al., 2006b; Kim et al., 2011). Όπως και στα προηγούμενα παραδείγματα, άλλες έρευνες αντικρούουν αυτά τα αποτελέσματα, εγείροντας σκέψεις σχετικά με το εάν τα αποτελέσματα των προηγούμενων μελετών επηρεάστηκαν από μη σωστή συντήρηση των δειγμάτων και το εάν ήταν ορθή η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε (Itoh et al., 2009; Huang et al., 2010; Weuve et al., 2010).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι οι φθαλικές ενώσεις δεν έχουν συσχετισθεί μόνο με αρνητικές επιπτώσεις στον άνθρωπο. Συγκεκριμένα, κάποιες ερευνητικές εργασίες υποστηρίζουν ότι υψηλότερα επίπεδα φθαλικών σε έγκυες μητέρες συσχετίζονται με χαμηλότερα ποσοστά εμφάνισης συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών (Polycystic Ovary Syndrome – PCOS) στις κόρες τους, ενώ όμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε αντίστοιχη μελέτη ενήλικων γυναικών (Hart et al., 2014; Vagi et al., 2014).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Δεδομένης της καθημερινής έκθεσης του ανθρώπου στις φθαλικές ενώσεις, τη δράση των ενώσεων αυτών που ασκείται ακόμη και σε πολύ χαμηλές δόσεις, το εύρος των ασθενειών με τις οποίες συνδέονται, καθώς και την παραμονή τους στον οργανισμό μετά το πέρας της έκθεσής του, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη για εκτενέστερη μελέτη, βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών δράσης, καθώς και για την εύρεση άλλων χημικών ενώσεων για την αντικατάστασή τους.

Το Πρόγραμμα EDC-MixRisk <http://edcmixrisk.ki.se/> αποτελεί τμήμα των προσπαθειών για την κατανόηση των επιπτώσεων ποικίλων χημικών ενώσεων στη δημόσια υγεία και το περιβάλλον. Ερευνητές από την Ευρώπη και την Αμερική, συνεργάζονται με στόχο την εξασφάλιση ασφαλέστερων συνθηκών διαβίωσης για τις μελλοντικές γενιές. Βάση του προγράμματος αποτέλεσαν δύο σημαντικές επιδημιολογικές μελέτες (SELMA και LIFE Child) οι οποίες, χρησιμοποιώντας δεδομένα από έγκυες μητέρες και τους απογόνους τους, βοήθησαν στον προσδιορισμό μειγμάτων EDCs που φαίνεται να συνδέονται με νευροαναπτυξιακές, φυλετικές, μεταβολικές και αναπτυξιακές διαταραχές του ανθρώπου. Στη συνέχεια, έντεκα εργαστήρια ανέλαβαν να διερευνήσουν τις τοξικές επιδράσεις των μειγμάτων αυτών με τη βοήθεια διαφόρων σύγχρονων εργαστηριακών μεθόδων και πειραματικών μοντέλων. Το εργαστήριο Βασικών Ιατροβιολογικών Επιστημών του Τμήματος Οδοντιατρικής του ΕΚΠΑ, συμμετέχει (partner) στη διεθνή ερευνητική ομάδα του Προγράμματος EDC-MixRisk μελετώντας τις επιπτώσεις από την πρόωμη έκθεση σε μίγματα ενδοκρινικών διαταρακτών σε μύες.

Στα πλαίσια του Προγράμματος αυτού, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη των επιπτώσεων ενδομήτριας έκθεσης μυών σε μίγμα φθαλικών εστέρων, στο αναπαραγωγικό σύστημα κατά την προεφηβεία και την ενήλικη ζωή. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε μέτρηση του βάρους σώματος και της πρωκτογεννητικής απόστασης, καθώς και ανάλυση της μορφολογίας της ωοθήκης θηλυκών απογόνων, σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Η σύσταση του μίγματος που χορηγήθηκε, βασίστηκε στις φθαλικές ενώσεις που εντοπίστηκαν στον ορό του αίματος των μητέρων της επιδημιολογικής μελέτης SELMA. Οι δόσεις που χορηγήθηκαν στους μύες αντιστοιχούν σε x10, x100 και x500 επίπεδα ανθρώπινης έκθεσης στη μελέτη SELMA.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη ήταν μύες του στελέχους C57/B16 που ανατράφηκαν στη μονάδα πειραματοζώων του Τμήματος Νοσηλευτικής του ΕΚΠΑ. Οι συνθήκες διαβίωσής τους ήταν σταθερές και ελεγχόμενες, με σταθερή θερμοκρασία ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), σταθερή φωτοπερίοδο (12 ώρες φως : 12 ώρες σκοτάδι) και *ad libitum* πρόσβαση σε ειδική τροφή ελεγχόμενη για την απουσία φυτοοιστρογόνων. Ο χειρισμός των ζώων έγινε σύμφωνα με τον κώδικα δεοντολογίας της Ευρωπαϊκής Ένωσης, European Communities Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU). Επιπλέον, έγινε προσπάθεια να μειωθεί, όσο το δυνατόν περισσότερο, ο αριθμός των πειραματοζώων και το σωματικό άλγος που υπέστησαν.

3.2 Σύσταση μίγματος φθαλικών εστέρων

Το μίγμα των φθαλικών εστέρων της παρούσας μελέτης (θα αναφέρεται στο εξής ως μίγμα S) περιείχε τέσσερις διαφορετικούς φθαλικούς μονοεστέρες: mono-butyl phthalate (MBP), mono-benzyl phthalate (MBzP), mono-ethyl hexyl phthalate (MEHP) και mono-iso nonyl phthalate (MINP). Οι αραιώσεις του αρχικού μίγματος (συγκέντρωσης 1M) γινόταν σε DMSO έτσι ώστε η συγκέντρωσή του να είναι 0.4mM, 4mM και 20mM για τις δόσεις x10, x100 και x500, αντίστοιχα. Οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν, βασίστηκαν στο γεγονός ότι σε μελέτες εκτίμησης κινδύνου χημικών ενώσεων (Risk Assessment) είναι απαραίτητο να υπολογίζεται ένα διάστημα περίπου 100 μονάδων συγκέντρωσης μεταξύ του NOAEL στα τρωκτικά και τα επίπεδα ασφαλούς έκθεσης του ανθρώπου. Επιπλέον, οι επιλεγμένες δόσεις βρίσκονταν εντός του πλαισίου των δόσεων που χρησιμοποιούνται σε ανάλογες μελέτες της βιβλιογραφίας.

3.3 Αναπαραγωγή και έκθεση στο μίγμα (S) των φθαλικών

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απόκτηση νεογνών ήταν η εξής: ένας ενήλικος θηλυκός μυς που βρισκόταν στη φάση του οίστρου, τοποθετήθηκε σε ένα κλουβί με έναν ενήλικο αρσενικό μυ. Την επόμενη ημέρα, έγινε έλεγχος για παρουσία σπερματικού βύσματος (vaginal plug) στο θηλυκό μυ και καταμέτρηση του βάρους σώματος. Παρουσία βύσματος, ξεκινούσε την ίδια ημέρα η έκθεση του θηλυκού στο μίγμα S η οποία διαρκούσε μέχρι το τέλος της εγκυμοσύνης (συνολική διάρκεια περίπου 20 – 21 ημέρες). Η έκθεση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μίας νιφάδας δημητριακών, εμποτισμένης με σκέτο διαλύτη DMSO ή με συγκεκριμένη συγκέντρωση μίγματος (x10, x100 και x500)

Η ποσότητα διαλύματος με την οποία εμποτίστηκε η κάθε νιφάδα εξαρτιόταν από το βάρος σώματος του θηλυκού και, κατ'επέκταση, ήταν διαφορετική κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Η ημέρα της γέννησης ορίστηκε ως μεταγεννητική ημέρα 0 (PND 0). Τα νεογνά παρέμεναν υπό τη φροντίδα της μητέρας μέχρι την PND 21 οπότε λάμβανε χώρα ο απογαλακτισμός και οι νεαροί μύες χωρίζονταν σε διαφορετικά κλουβιά ανάλογα με το φύλο τους.

Ανάλογα με τις συγκεντρώσεις μίγματος στις οποίες εκτέθηκαν οι θηλυκοί μύες (x10, x100 και x500), τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τρεις πειραματικές ομάδες (S10, S100 και S500). Ο αριθμός των μητέρων που ταΐστηκαν για κάθε ομάδα ήταν 6, 5 και 3 αντίστοιχα. Ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν οι απόγονοι των θηλυκών μυών που είχαν ταϊστεί με νιφάδες εμποτισμένες με σκέτο διαλύτη DMSO. Ο αριθμός των μητέρων που ταΐστηκαν με DMSO ήταν 9.

3.4 Μέτρηση βάρους σώματος

Μέτρηση του βάρους σώματος (g) πραγματοποιήθηκε δεδομένου ότι επηρεάζεται από έκθεση σε μεμονωμένους φθαλικούς εστέρες. Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα σε τρεις διαφορετικές ηλικίες, μεταγεννητική ημέρα 1, 21 και 90 (PND 1, PND 21, PND 90) και χρησιμοποιήθηκαν, για την κανονικοποίηση της πρωκτογεννητικής απόστασης και τους βάρους των ωοθηκών. Για την πραγματοποίηση της μέτρησης, γινόταν τοποθέτηση κάθε πειραματοζώου σε κατάλληλο πλαστικό δοχείο που βρισκόταν πάνω στο ζυγό, το βάρους του οποίου είχε προηγουμένως μηδενιστεί. Μεταξύ διαδοχικών μετρήσεων, το πλαστικό δοχείο καθαριζόταν με χαρτί και νερό.

3.5 Πρωκτογεννητική απόσταση (Anogenital Distance, AGD)

Η απόσταση μεταξύ πρωκτού και γεννητικών οργάνων (AGD) χρησιμοποιείται πολύ συχνά σε τοξικολογικές μελέτες ως δείκτης που επηρεάζεται από τα επίπεδα ανδρογόνων κατά την κύηση (Barrett and Swan, 2015). Την PND 1 πραγματοποιήθηκε η πρώτη καταμέτρηση του AGD. Για μεγαλύτερη ακρίβεια, λόγω του μικρού μεγέθους των νεογνών και για τη λιγότερη ενόχλησή τους, η επιθυμητή περιοχή φωτογραφίστηκε με σταθερά τοποθετημένη φωτογραφική μηχανή, ώστε να εξασφαλισθεί η ομοιογένεια των τελικών μετρήσεων. Στη συνέχεια, κάθε φωτογραφία χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της AGD με τη βοήθεια του προγράμματος Image J (Version 1.50i). Τις ημέρες PND 21 και PND 90, η AGD μετρήθηκε άμεσα με τη βοήθεια ψηφιακού παχύμετρου.

3.6 Έλεγχος εισόδου των θηλυκών ποντικών στην εφηβεία

Η είσοδος των θηλυκών στην εφηβεία, πιστοποιήθηκε με το άνοιγμα του κόλπου (VO). Το VO λαμβάνει χώρα πριν από την εμφάνιση του πρώτου οιστρικού κύκλου και διαμεσολαβείται από κυτταρική απόπτωση. Στη μελέτη μας, όπως και σε ανάλογες μελέτες, οι θηλυκοί μύες ελέγχονται καθημερινά από τον ίδιο παρατηρητή από την PND 28 μέχρι την εμφάνιση του κολπικού ανοίγματος. Η διαδικασία πραγματοποιείται με τρόπο που να μην προκαλείται οποιουδήποτε είδους στρες στο ελεγχόμενο πειραματόζωο.

3.7 Θυσίες των πειραματοζώων

Θυσίες θηλυκών απογόνων, επιλεγμένων ώστε από κάθε γέννα να περιλαμβάνονται μύες και των δύο ηλικιών σε κάθε πειραματική ομάδα, πραγματοποιούνται μετά από αναισθησία με ισοφλουράνιο. Στα ενήλικα θηλυκά ακολούθησε λήψη κοιλιακού επιχρίσματος για προσδιορισμό της φάσης του οιστρικού κύκλου και λήψη των ωοθηκών. Η αριστερή ωοθήκη τοποθετήθηκε σε προζυγισμένο σωλήνα erpendorf, προσδιορίστηκε το βάρος της και αμέσως μετά μεταφέρθηκε στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -80°C . Η δεξιά ωοθήκη τοποθετήθηκε απευθείας σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης (PFA) 4% όπου παρέμεινε για 24 ώρες, στους 4°C .

3.8 Προσδιορισμός φάσης του οιστρικού κύκλου

Η φάση του οιστρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται ένας θηλυκός μυς, προσδιορίζεται με διαφορετικούς τρόπους, όπως για παράδειγμα με λήψη κοιλιακού επιχρίσματος και προσδιορισμό της μορφολογίας των επιθηλιακών κυττάρων του κόλπου. Τα κοιλικά επιχρίσματα συλλέγονται ως εξής: με τη βοήθεια πιπέτας, εγχύεται μέσα στον κόλπο διάλυμα φυσιολογικού ορού (NaCl 0.9%) επαναροφάται και επιστρώνεται πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Τα κοιλικά επιχρίσματα αφήνονται να στεγνώσουν. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 3 λεπτά, ξεπλένονται με νερό βρύσης για 5 λεπτά, αφυδατώνονται σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθυλικής αλκοόλης, ξυλόλης και τελικά καλύπτονται με ειδική ρητίνη κάλυψης (Entellan, 1.07961 EMD Millipore) και καλυπτρίδα για παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Η φάση του οιστρικού κύκλου προσδιορίζεται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, με βάση τη μορφολογία των κυττάρων: στον πρόοιστρο κυριαρχούν τα εμπύρρινα επιθηλιακά κύτταρα, στον οίστρο τα απύρρινα κερατινοποιημένα, στο μέθοιστρο παρατηρούνται όλοι οι τύποι κυττάρων (επιθηλιακά, κερατινοποιημένα και λευκοκύτταρα), ενώ στο δίοιστρο επικρατούν τα λευκοκύτταρα (Caligioni, 2009) (Εικόνα 4). Στην παρούσα εργασία, το στάδιο του κύκλου χρησιμοποιήθηκε ως συμπαραγόντας στη στατιστική ανάλυση, καθώς θα μπορούσε να μεταβάλλει τη μορφολογία ή/και τη φυσιολογία των ωοθηκών.

3.9 Μονιμοποίηση ιστών

Για την εξέταση της μορφομετρίας των ωοθηκών, οι ιστοί πρέπει προηγουμένως να μονιμοποιηθούν. Για το σκοπό αυτό οι ωοθήκες απομακρύνονται από την PFA μετά από ένα 24ωρο, ξεπλένονται για 1 ώρα με νερό βρύσης και ακολουθεί σταδιακή αφυδάτωσή τους σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθυλικής αλκοόλης (70%, 80%, 90%, 100%). Στη συνέχεια, εμβαπτίζονται σε διάλυμα ξυλόλης 2 φορές και τοποθετούνται σε δοχεία υγρής παραφίνης για εμποτισμό, σε κλίβανο 67°C . Την επόμενη μέρα κάθε ωοθήκη εγκλείεται σε κύβο παραφίνης.

3.10 Μορφομετρία των ωοθηκών

Η διαδικασία που ακολουθείται για τη μελέτη της μορφολογίας των ωοθηκών είναι η εξής: διαδοχικές τομές πάχους 4μm συλλέγονται με τη βοήθεια μικροτόμου παραφίνης (Leica) και βάφονται με χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης. Η αιματοξυλίνη συνδέεται στο αρνητικά φορτισμένο DNA και βάφει μωβ κυρίως τους πυρήνες των κυττάρων, ενώ η ηωσίνη προσδένεται σε θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες και ινίδια του κυτταροσκελετού, προσδίδοντας ροζ χρώμα στο κυτταρόπλασμα. Πιο συγκεκριμένα, οι τομές τοποθετούνται σε κλίβανο για 30 – 40 λεπτά, στους 65°C και αμέσως αποπαραφινώνονται σε ξυλόλη (δύο αλλαγές επί 8 λεπτά). Στη συνέχεια ενυδατώνονται σε διαδοχικά διαλύματα μειούμενης συγκέντρωσης αιθυλικής αλκοόλης (100%, 90%, 80%, 70%), ξεπλένονται σε τρεχούμενο νερό, εμβαπτίζονται σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 5 λεπτά και ξεπλένονται σε τρεχούμενο νερό. Ακολουθεί σύντομη εμβάπτιση σε όξινο διάλυμα 3% HCl αραιωμένου σε 70% αιθανόλη, για 3 φορές και ξέπλυμα με τρεχούμενο νερό. Τελευταίο στάδιο της χρώσης αποτελεί η εμβάπτιση σε διάλυμα ηωσίνης για 3 λεπτά και το ξέπλυμα με τρεχούμενο νερό. Για τη διατήρηση των τομών, γίνεται αφυδάτωση σε διαλύματα αιθανόλης, σταδιακά αυξανόμενης συγκέντρωσης, τοποθέτηση σε ξυλόλη δύο φορές για 8 λεπτά και τοποθέτηση καλυπτρίδων με τη χρήση ειδικής ρητίνης κάλυψης (Entellan, 1.07961 EMD Millipore).

Κάθε 10ⁿ ή κάθε 15ⁿ τομή χρησιμοποιήθηκε για τη μορφομετρία των προ-εφηβικών και των ενήλικων ωοθηκών, αντιστοίχως. Η παρατήρηση των τομών έγινε με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου (Olympus), σε μεγέθυνση 100x, από δύο διαφορετικούς παρατηρητές ξεχωριστά. Οι κατηγορίες ωοθυλακίων που αξιολογήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν οι εξής: πρωτογενή (ωοκύτταρο περιβαλλόμενο από μία μονή στιβάδα κυβοειδών κοκκιωδών κυττάρων), δευτερογενή/προκοιλωματικά (ωοκύτταρο περιβαλλόμενο από δύο ή περισσότερες στιβάδες κοκκιωδών κυττάρων χωρίς παρουσία άντρου), κοιλωματικά ωοθυλάκια (παρουσία άντρου) και ωχρά σωμάτια. Για να αποφευχθεί η μέτρηση του ίδιου ωοθυλακίου πάνω από μία φορά, μόνο τα υγιή ωοθυλάκια με εμφανή πυρήνα καταμετρήθηκαν σε κάθε τομή. Ως ατρητικά ωοθυλάκια θεωρήθηκαν τα ωοθυλάκια εκείνα που εμφάνιζαν τουλάχιστον δύο από τα παρακάτω χαρακτηριστικά: εκφυλισμένο ωοκύτταρο, 3 ή περισσότερους πυκνωτικούς πυρήνες ή ατρητικά σωμάτια στις κοκκιώδεις στιβάδες ή στο ωοθυλακικό άντρο, αποδιοργανωμένες κοκκιώδεις στιβάδες, κοκκιώδεις στιβάδες αποκολλημένες από τη βασική μεμβράνη ή διαρρηγμένη βασική μεμβράνη. Τέλος, σε ορισμένες ωοθήκες ενήλικων μυών, παρατηρήθηκαν ωοθηκικές κύστεις οι οποίες χαρακτηρίζονται ως κοιλότητες περιβαλλόμενες από μία λεπτή στιβάδα κυττάρων θήκης και κοκκιωδών κυττάρων με πολύ συμπακνωμένη δομή (Britt et al., 2000; Sen and Hammes, 2010).

Για την αποφυγή διαφορών λόγω της διακύμανσης του μεγέθους ή του διαφορετικού τρόπου κοπής των ωοθηκών, κάθε τομή φωτογραφήθηκε με τη χρήση στερεοσκοπίου (Leica M80, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) και ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (Leica DFC295, Leica Microsystems) και στη συνέχεια οι φωτογραφίες χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της επιφάνειας (mm^2), με τη βοήθεια του προγράμματος Image J (Version 1.50i). Τέλος, ο συνολικός αριθμός των ωοθυλακίων κάθε τομής, διαιρέθηκε με την επιφάνεια της τομής και υπολογίστηκε η πυκνότητά τους ως αριθμός ωοθυλακίων ανά mm^2 .

3.11 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση RNA χρησιμοποιείται ευρέως ως αρχικό βήμα για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης συγκεκριμένων κυττάρων ή ολόκληρων ιστών. Στη συγκεκριμένη μελέτη, πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA από τους παγωμένους ωοθηκικούς ιστούς, χρησιμοποιώντας Trizol (Life Technologies). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, σε κάθε ωοθήκη προστίθεται TRIzol™ Reagent ανάλογα με την ποσότητα του ιστού και ο ιστός ομογενοποιείται. Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη χλωροφορμίου και επώαση για άλλα 3 λεπτά. Τέλος, το διάλυμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στους 4°C και απομονώνεται η υδατική φάση η οποία περιέχει το ολικό RNA.

Η καθαρότητα του RNA και η ποσότητα που απομονώθηκε, επιβεβαιώθηκε με τη βοήθεια της ειδικής συσκευής φωτομέτρησης NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) και συγκεκριμένα μέσω του λόγου A260/A280, ο οποίος για όλα τα δείγματα είχε τιμή από 1,80 μέχρι 2,10. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν κυρίως σε μήκος κύματος 260nm ενώ οι πρωτεΐνες απορροφούν σε μήκος κύματος 280nm, επομένως ο λόγος των δύο απορροφήσεων αποτελεί ένδειξη της καθαρότητας του νουκλεϊκού οξέος που έχει απομονώνεται. Στη συνέχεια, η ποιότητα του RNA προσδιορίστηκε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v.

3.12 qRT – PCR

Για τον προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *fshr* στην ωοθήκη, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος qRT – PCR, μία παραλλαγή της απλής μεθόδου PCR η οποία επιτρέπει τον εκτεταμένο πολλαπλασιασμό μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA *in vitro*, χωρίς τη χρήση ζωντανού οργανισμού (Mullis et al., 1986). Σύμφωνα με τη μέθοδο qRT – PCR, αρχικά δημιουργείται cDNA με αντίστροφη μεταγραφή του ολικού RNA των ωοθηκών (0,5 μg). Για τη διεξαγωγή της διαδικασίας αυτής τοποθετείται σε ειδικό αποστειρωμένο σωληνάκι: ρυθμιστικό διάλυμα, αντίστροφη μεταγραφάση, εκκινητές oligo dT, τυχαία εξαμερή, ολικό RNA και RNase free νερό (PrimeScript™ RT Reagent Kit – Perfect Real Time, Takara). Στη συνέχεια, τα πλαστικά σωληνάκια μεταφέρονται σε θερμικό κυκλοποιητή, όπου επωάζονται για 15 λεπτά στους 37°C , για 5 δευτερόλεπτα στους 85°C και στο τέλος επανέρχονται στους 4°C .

Το παραγόμενο cDNA διαλυτοποιείται έτσι ώστε η τελική αραίωση του διαλύματος να είναι 1:40 και 5μl αυτού και χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση PCR πραγματικού χρόνου (real time polymerase chain reaction). Πιο αναλυτικά, κάθε δείγμα cDNA τοποθετείται σε ξεχωριστό σωλήνα σε ειδικό πλαστικό 96 θέσεων, όπου έχουν ήδη προστεθεί τα κατάλληλα αντιδραστήρια: Master Mix, ζεύγος εκκινητών, ROX χρώση αναφοράς και ddH₂O (KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix 2X Kit, Sigma-Aldrich). Στη συνέχεια, οι σωλήνες τοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή Mx3005P Real-Time PCR System (Agilent), ακολουθεί αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 3 λεπτά και αμέσως μετά 40 διαδοχικοί κύκλοι καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει 30 δευτερόλεπτα στους 95°C, 30 δευτερόλεπτα στους 59°C και 45 δευτερόλεπτα στους 72°C. Στη συγκεκριμένη μελέτη, για κάθε ζώο πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις σε ξεχωριστούς σωλήνες και ο μέσος όρος των μετρήσεων τους χρησιμοποιήθηκε τελικά για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε η β-ακτίνη. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τη βάση δεδομένων της PrimerBank και οι αλληλουχίες τους ήταν οι εξής:

Γονίδιο	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	PrimerBank ID / citation
β – actin	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	6671509a1
Fshr	TGCTCTAACAGGGTCTTCCTC	TCTCAGTTCAATGGCGTCCG	242397445c1

Η ειδικότητα του προϊόντος κάθε αντίδρασης προσδιορίστηκε με τη βοήθεια της καμπύλης αποδιάταξης (melting curve), ενώ το μέγεθος των προϊόντων ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v.

Για τον υπολογισμό των σχετικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *Fshr* χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές των CTs. Η τιμή CT για κάθε δείγμα, καθορίζεται στην εκθετική φάση αύξησης και πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων ενίσχυσης που αντιστοιχεί σε μία συγκέντρωση A, κοινή για όλα τα δείγματα. Η συγκέντρωση A, αντιστοιχεί στην τιμή του φθορισμού που ορίζεται αυτόματα από το πρόγραμμα ως το μέσο της εκθετικής φάσης ενίσχυσης όλων των δειγμάτων, με βάση τη θεωρία ότι ο φθορισμός είναι ανάλογος της συγκέντρωσης του DNA.

Κάθε CT χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης του επιθυμητού γονιδίου ως προς την έκφραση του ίδιου γονιδίου σε ένα δείγμα αναφοράς. Στην προκειμένη περίπτωση δείγματα αναφοράς αποτέλεσαν εκείνα της ομάδας DMSO. Για κάθε δείγμα προσδιορίζεται η διαφορά μεταξύ των CTs του προς μελέτη γονιδίου κι ενός ενδογενούς γονιδίου αναφοράς: $\Delta CT_{\text{treated}} = CT_{\text{Fshr}} - CT_{\beta\text{actin}}$ για τα δείγματα προς μελέτη (S10, S100, S500) και $\Delta CT_{\text{control}} = CT'_{\text{Fshr}} - CT'_{\beta\text{actin}}$ για τα δείγματα αναφοράς. Στη συνέχεια υπολογίζεται το $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{control}} - \Delta CT_{\text{treated}}$ και το $2^{-\Delta\Delta CT}$ χρησιμοποιείται τελικά για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης του επιθυμητού γονιδίου, λαμβάνοντας υπόψη ότι η αντίδραση διπλασιάζει το ποσό του προϊόντος σε κάθε κύκλο (Livak and Schmittgen, 2001).

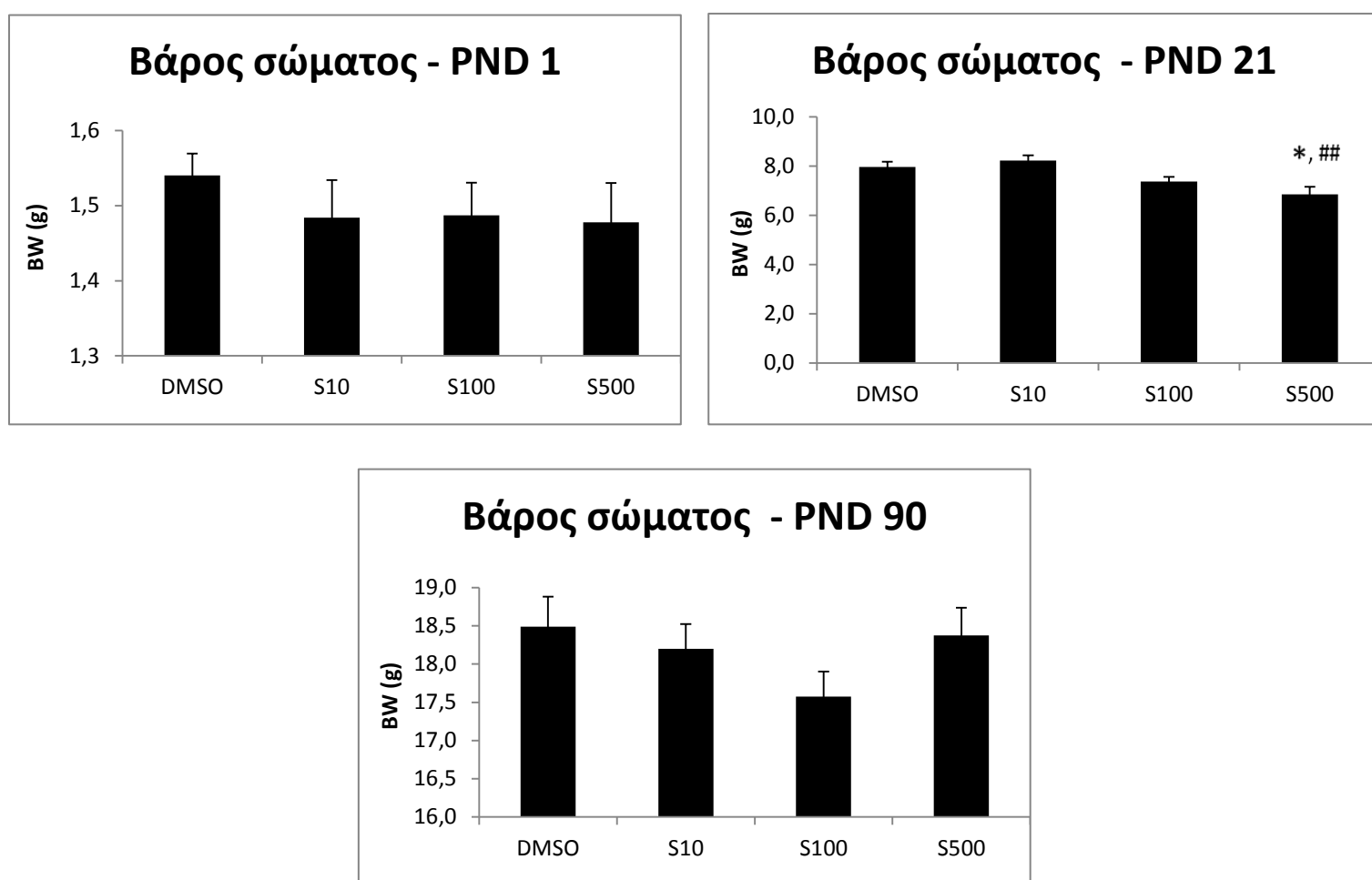
3.13 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα για όλες τις παραμέτρους που μελετήθηκαν, αναλύθηκαν στατιστικά με Ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης (one way ANOVA), με ανεξάρτητη μεταβλητή τη δόση μίγματος S στην οποία είχαν εκτεθεί οι διαφορετικές ομάδες ζώων. Όταν διαπιστωνόταν στατιστικά σημαντική διαφορά, ακολουθούσε μετα-ανάλυση με δοκιμασία Bonferroni. Το όριο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο $p = 0.05$ και η ανάλυση έγινε με το στατιστικό πακέτο SPSS v.21.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Βάρος σώματος

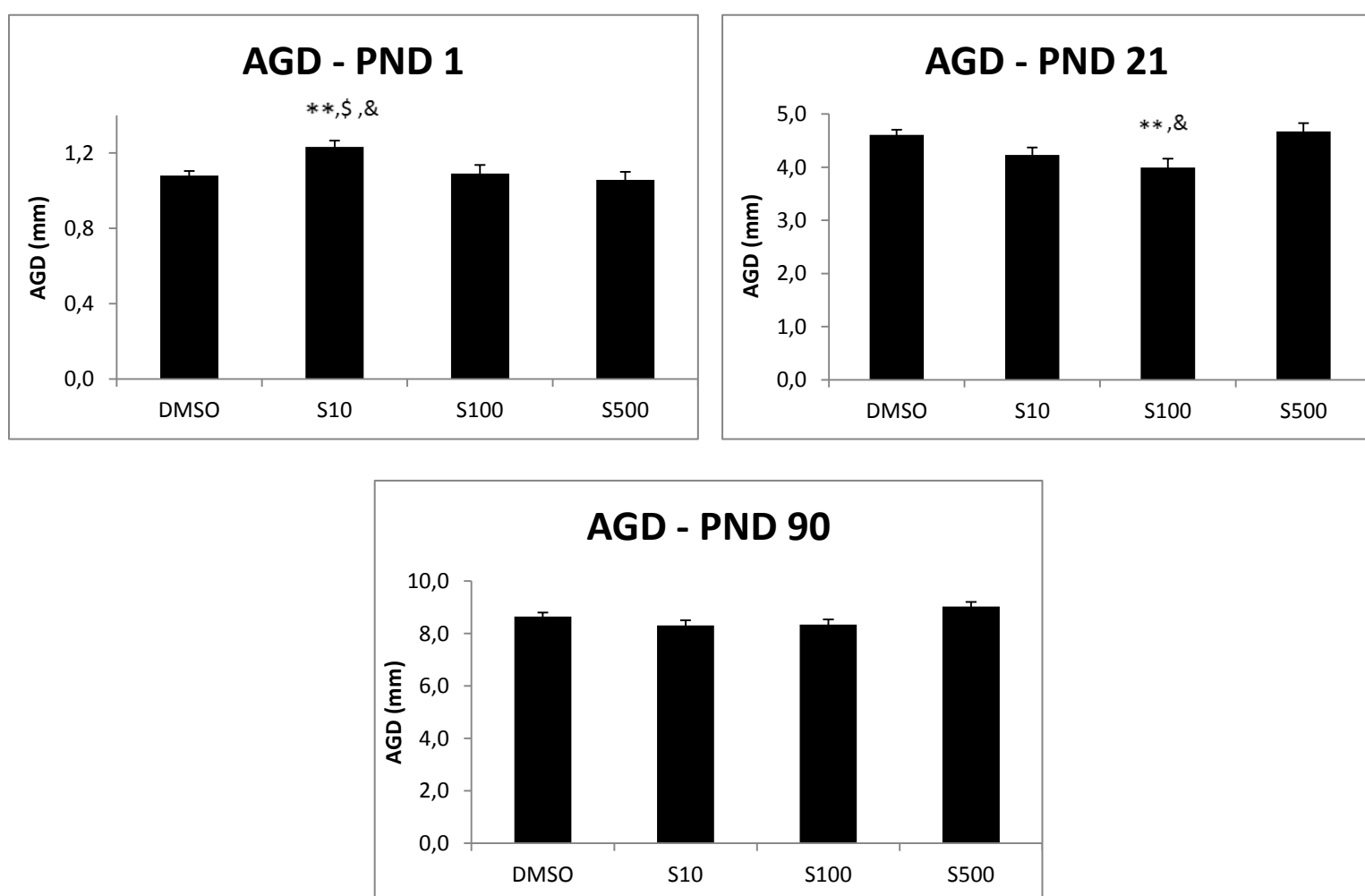
Οι θηλυκοί μύες της F1 γενιάς ζυγίστηκαν την πρώτη ημέρα μετά τη γέννηση (PND 1), κατά την προεφηβεία (PND 21) και κατά την ενήλικη ζωή (PND 90). Ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με εξαρτημένη μεταβλητή το βάρος σώματος, έδειξε ότι την PND 21 το βάρος των θηλυκών μυών διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων ($F_{(3,62)}=5.360$, $p=0.002$). Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τη μετα-ανάλυση κατά Bonferroni, το βάρος σώματος της ομάδας S500 ήταν σημαντικά μικρότερο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p=0.024$) και την ομάδα S10 ($p=0.005$). Στις άλλες δύο ηλικίες που μελετήθηκαν, PND 1 και PND 90, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων.



Διαγρ. 1: Επίδραση του μίγματος φθαλικών στο βάρος σώματος θηλυκών μυών. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή του βάρους κάθε ομάδας \pm Τυπικό Σφάλμα Μέσης Τιμής (Standard Error of Mean, SEM). * στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα DMSO, *P < 0.05, # στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα S10, ##P < 0.01. Ο αριθμός των πειραματοζώων που χρησιμοποιήθηκαν στη στατιστική ανάλυση ήταν: 27 DMSO, 18 S10, 14 S100, 9 S500 (PND 1); 24 DMSO, 17 S10, 14 S100, 8 S500 (PND 21); 14 DMSO, 9 S10, 9 S100, 5 S500 (PND 90).

4.2 Πρωκτογεννητική απόσταση (AGD)

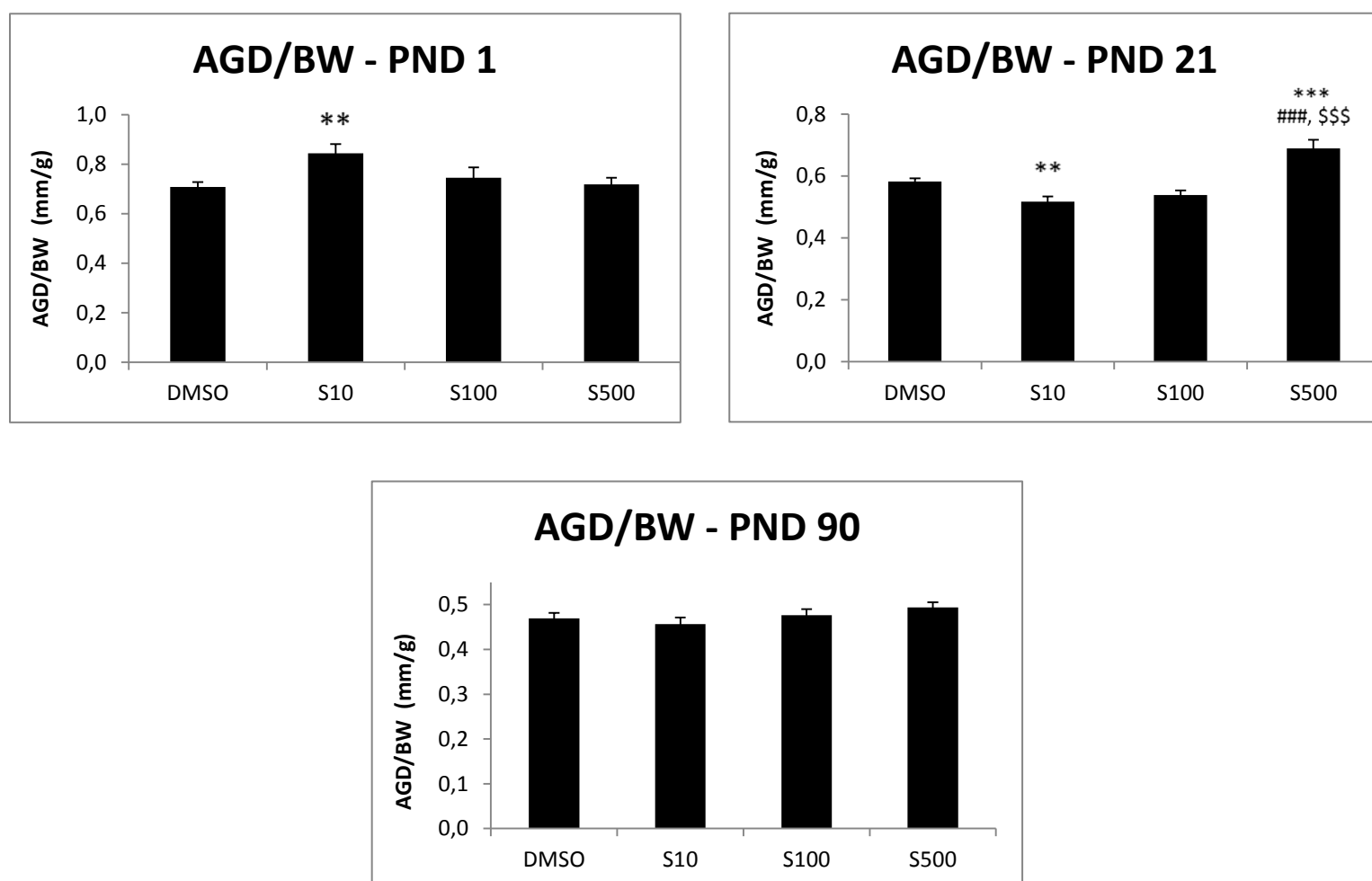
Η πρωκτογεννητική απόσταση (AGD) μετρήθηκε κατά τις ημέρες PND 1, PND 21 και PND 90. Ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με εξαρτημένη μεταβλητή την πρωκτογεννητική απόσταση, έδειξε σημαντική διαφορά των AGDs την PND 1 ($F_{(3,67)}=5.235$, $p=0.003$) και την PND 21 ($F_{(3,62)}=5.165$, $p=0.003$). Συγκεκριμένα, μετα-ανάλυση κατά Bonferroni έδειξε ότι την PND 1 η ομάδα S10 παρουσίαζε μεγαλύτερο AGD από όλες τις άλλες ομάδες [vs. DMSO ($p=0.005$), vs. S100 ($p=0.043$) και vs. S500 ($p=0.022$)]. Μετα-ανάλυση κατά Bonferroni έδειξε επίσης, ότι την PND 21 η ομάδα S100 παρουσίαζε μικρότερο AGD από τις ομάδες DMSO ($p=0.007$) και S500 ($p=0.034$). Την PND 90 δε βρέθηκε καμία διαφορά μεταξύ των ομάδων ως προς το AGD.



Διαγρ. 2: Επίδραση του μίγματος φθαλικών στο AGD. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή του AGD κάθε ομάδας \pm SEM. * στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα DMSO, $*P < 0.01$, \$ στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα S100, $P < 0.05$, & στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα S500, $P < 0.05$. Ο αριθμός των πειραματοζώων που χρησιμοποιήθηκαν στη στατιστική ανάλυση ήταν: 27 DMSO, 18 S10, 14 S100, 9 S500 (PND 1); 24 DMSO, 17 S10, 14 S100, 8 S500 (PND 21); 14 DMSO, 9 S10, 9 S100, 5 S500 (PND 90).

4.3 Λόγος AGD / βάρος σώματος

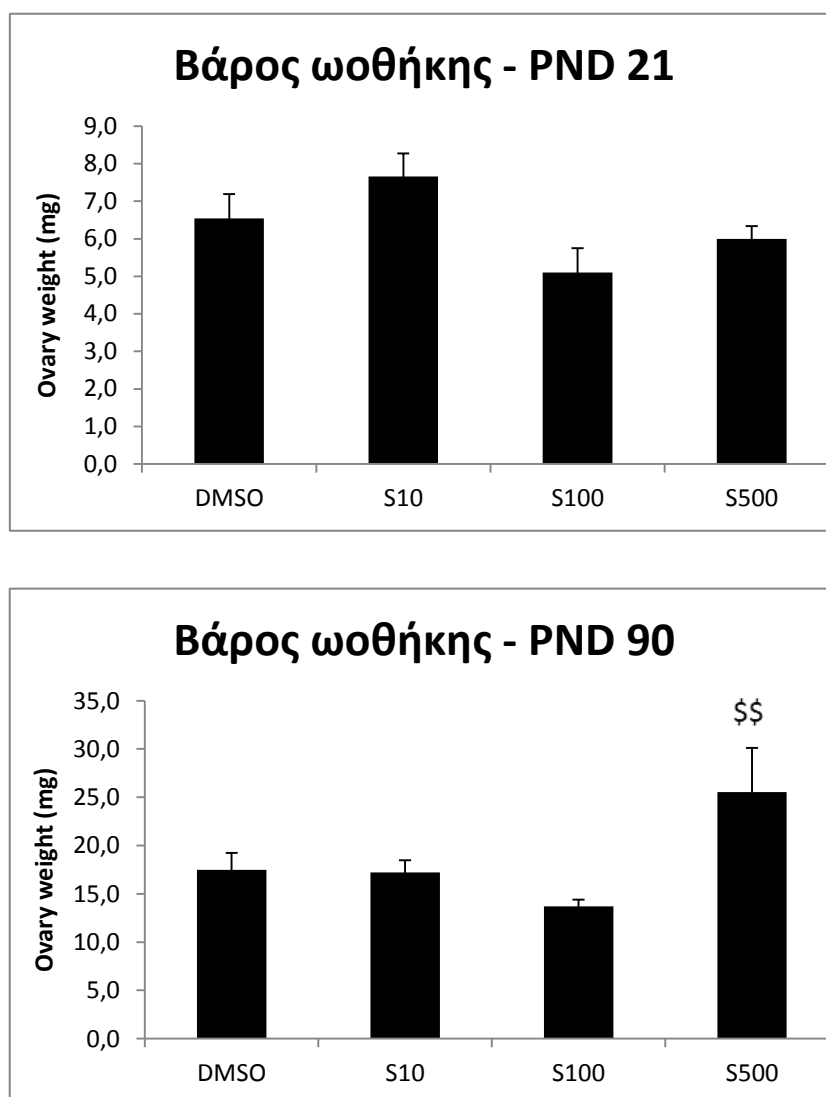
Κανονικοποίηση του δείκτη AGD με το βάρος σώματος έδειξε, με ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης, στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων τις ημέρες PND 1 ($F_{(3,67)}=4.492$, $p=0.006$) και PND 21 ($F_{(3,62)}=16.113$, $p<0.001$). Σύμφωνα με μετα-ανάλυση κατά Bonferroni, την PND 1 ο λόγος AGD / BW ήταν μεγαλύτερος στην ομάδα S10 σε σχέση με την ομάδα DMSO ($p=0.005$). Την PND 21 ο λόγος AGD / BW ήταν μεγαλύτερος στην ομάδα S500 σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες ($p<0.001$), ενώ ο λόγος της ομάδας S10 ήταν σημαντικά μικρότερος ως προς την ομάδα ελέγχου ($p=0.008$). Την PND 90 δε βρέθηκε καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ως προς το δείκτη AGD.



Διαγρ. 3: Επίδραση του μίγματος φθαλικών στο λόγο AGD/BW. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή του λόγου κάθε ομάδας \pm SEM. * στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα DMSO, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, # στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα S10, ### $P < 0.001$, \$ στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα S100, \$\$\$ $P < 0.001$. Ο αριθμός των πειραματόζων που χρησιμοποιήθηκαν στη στατιστική ανάλυση ήταν: 27 DMSO, 18 S10, 14 S100, 9 S500 (PND 1); 24 DMSO, 17 S10, 14 S100, 8 S500 (PND 21); 14 DMSO, 9 S10, 9 S100, 5 S500 (PND 90).

4.4 Βάρος ωοθηκών

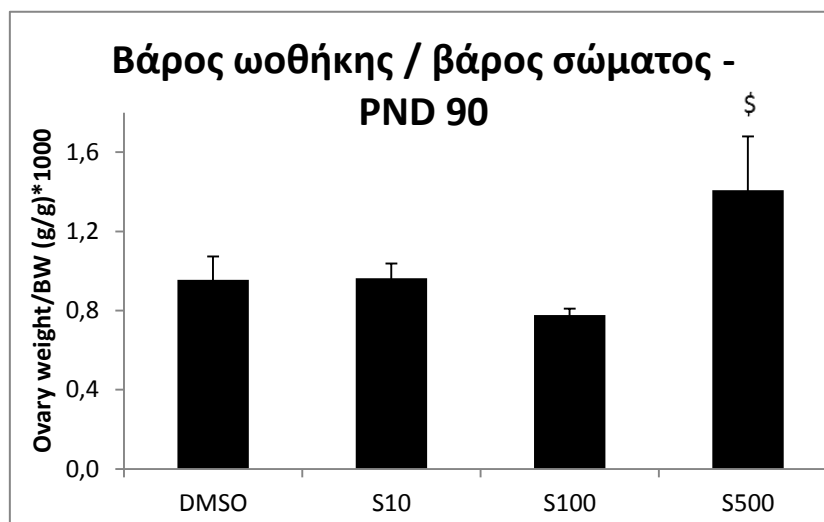
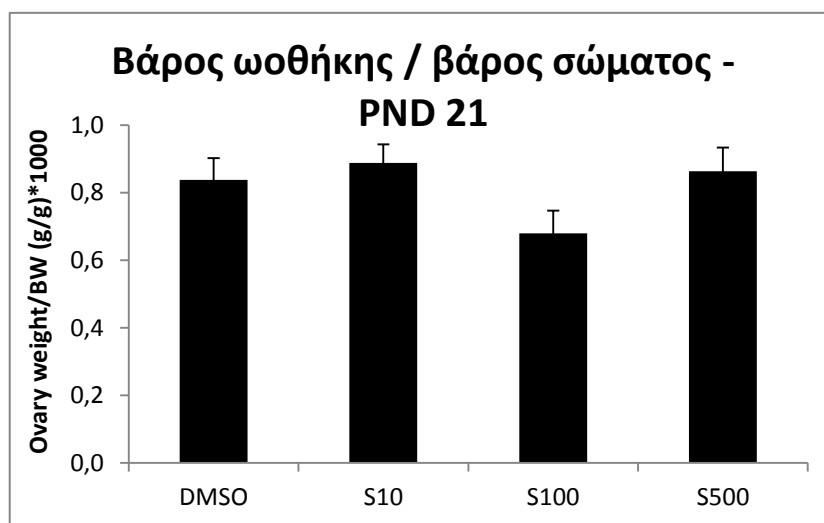
Μεταξύ των ωοθηκών που συλλέχθηκαν την PND 21 δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς το βάρος. Αντιθέτως, τα βάρη των ωοθηκών την PND 90 διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ομάδων ($F_{(3,31)}=4.903$, $p=0.007$) μετά από ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης. Συγκεκριμένα, μετα-ανάλυση κατά Bonferroni έδειξε ότι η ομάδα S500 εμφάνιζε μεγαλύτερο βάρος από την ομάδα S100 ($p=0.004$).



Διαγρ. 4: Επίδραση του μίγματος φθαλικών στο βάρος των ωοθηκών θηλυκών μυών. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή του ωοθηκικού βάρους κάθε ομάδας \pm SEM. \$ στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα S100, $\$P < 0.01$. Ο αριθμός των πειραματοζώων που χρησιμοποιήθηκαν στη στατιστική ανάλυση ήταν: 9 DMSO, 8 S10, 8 S100, 4 S500 (PND 21); 11 DMSO, 7 S10, 9 S100, 5 S500 (PND 90).

4.5 Λόγος βάρους ωοθήκης / βάρους σώματος

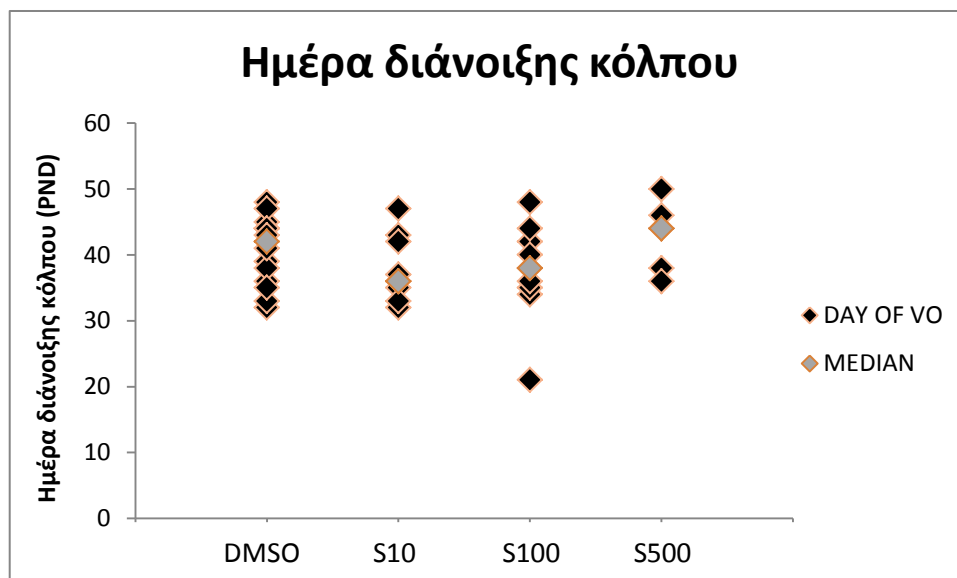
Την PND 21 ο λόγος του βάρους ωοθήκης προς το βάρους σώματος (κανονικοποιημένο βάρους ωοθήκης) δεν παρουσίαζε καμία διαφορά μεταξύ των ομάδων. Την PND 90, όμως, ο ίδιος λόγος βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά ($F_{(3,31)}=3.659$, $p=0.024$), σύμφωνα με την ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης. Η διαφορά, μετά από μετα-ανάλυση κατά Bonferroni, παρατηρήθηκε μεταξύ των ομάδων S100 και S500, με το μεγαλύτερο λόγο να εμφανίζει η ομάδα S500 ($p=0.016$). Η διαφορά αυτή ήταν αναμενόμενη δεδομένου ότι το βάρους των ωοθηκών εμφάνιζε επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ίδιων ομάδων, ενώ το βάρους σώματος όχι.



Διαγρ. 5: Επίδραση του μίγματος φθαλικών στο λόγο: βάρους ωοθήκης προς βάρους σώματος. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή του λόγου κάθε ομάδας \pm SEM. \$ στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα S100, $SP < 0.05$. Ο αριθμός των πειραματόζώων που χρησιμοποιήθηκαν στη στατιστική ανάλυση ήταν: 9 DMSO, 8 S10, 5 S100, 4 S500 (PND 21); 11 DMSO, 7 S10, 9 S100, 5 S500 (PND 90).

4.6 Ηλικία εισόδου στην εφηβεία – ημέρα διάνοιξης κόλπου (Vaginal opening)

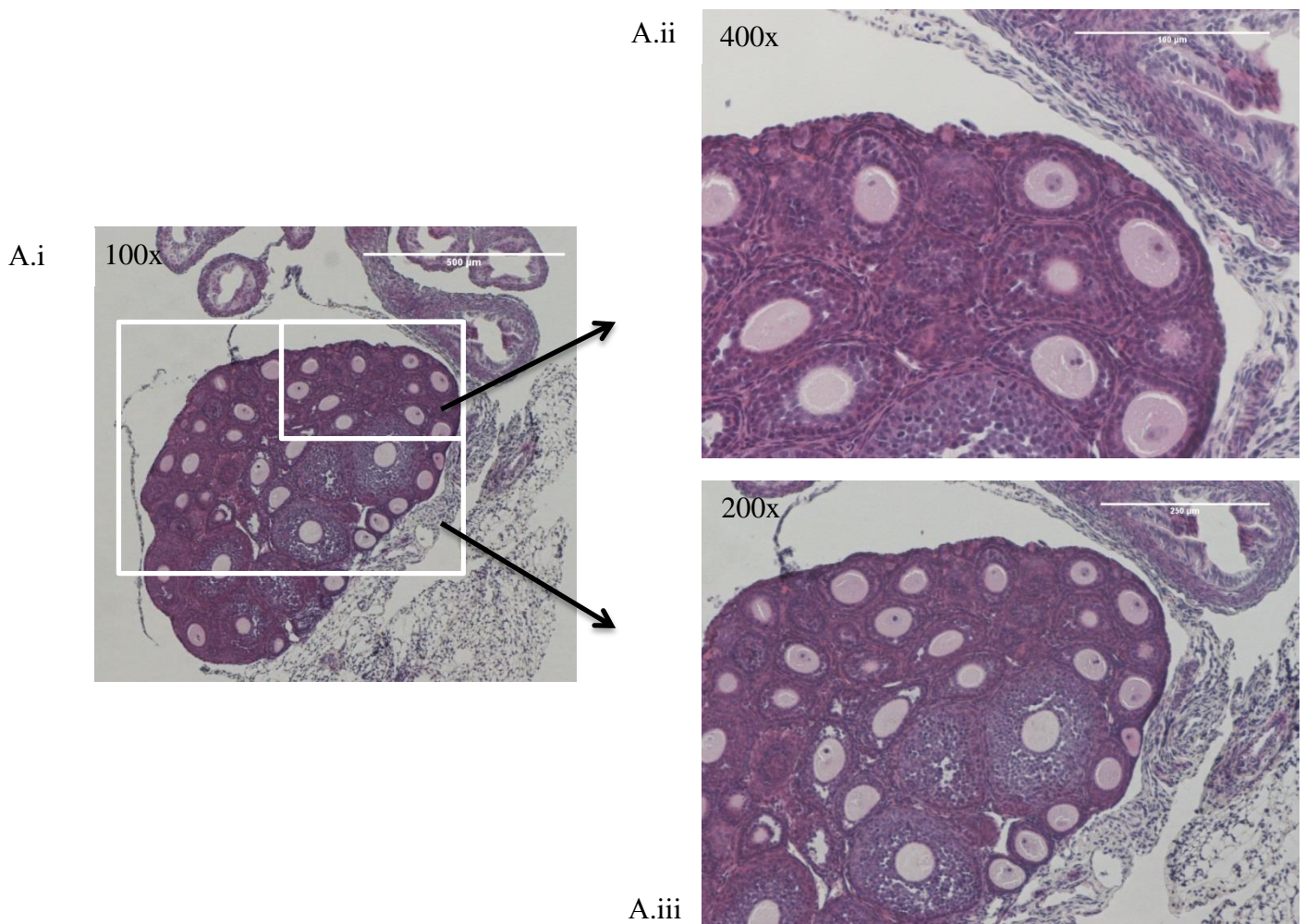
Όσον αφορά την είσοδο στην εφηβεία, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων που μελετήθηκαν στην ηλικία ανοίγματος του κόλπου. Αξίζει να σημειωθεί, παρόλα αυτά, ότι ένα θηλυκό της ομάδας S100 παρουσίασε VO την PND 21, πολύ πιο νωρίς από όλα τα υπόλοιπα ζώα που αξιολογήθηκαν.



Διάγρ. 6: Επίδραση του μίγματος φθαλικών στην έναρξη της εφηβείας (άνοιγμα κόλπου). Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την κατανομή κάθε ομάδας ως προς την ηλικία και το ανοιχτό πορτοκαλί συμβολίζει τη διάμεσο κάθε ομάδας. Ο αριθμός των πειραματόζων που χρησιμοποιήθηκαν στη στατιστική ανάλυση ήταν: 14 DMSO, 9 S10, 9 S100, 5 S500.

4.7 Μορφολογία ωοθήκης – στην ηλικία των 21 ημερών

Στην PND 21 μελετήθηκαν οι εξής κατηγορίες ωοθυλακίων: πρωτογενή (primary), δευτερογενή (secondary), πρώιμα κοιλωματικά (early antral) και ατρητικά (atretic). Στατιστική ανάλυση των μετρήσεων με ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης έδειξε ότι η μόνη κατηγορία ωοθυλακίων στην οποία παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ήταν τα ατρητικά ωοθυλάκια ($F_{(3,23)}=4.343$, $p=0.016$). Μετα-ανάλυση κατά Bonferroni έδειξε συγκεκριμένα, ότι η ομάδα S500 παρουσίαζε σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό ατρητικών ωοθυλακίων ανά μονάδα επιφάνειας από την ομάδα ελέγχου DMSO ($p=0.047$).

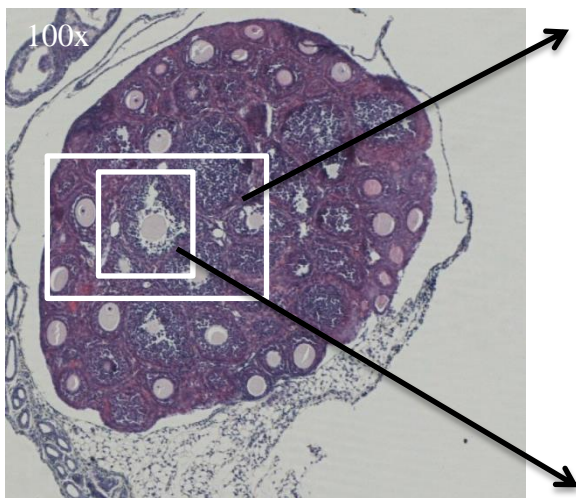


Εικόνα 9: Τομές ωοθηκών θηλυκών μυών με χρώση αιματοξυλίνης και εωσίνης. Σε κάθε φωτογραφία σημειώνεται η συνολική μεγέθυνση που επιτεύχθηκε με το μικροσκόπιο Nikon Coolscope II που χρησιμοποιήθηκε (100x, 200x, 400x, 800x). Σε μία εικόνα από κάθε μεγέθυνση εμφανίζεται κλίμακα αναφοράς (500μm, 250 μm, 100μm, 50μm αντίστοιχα).

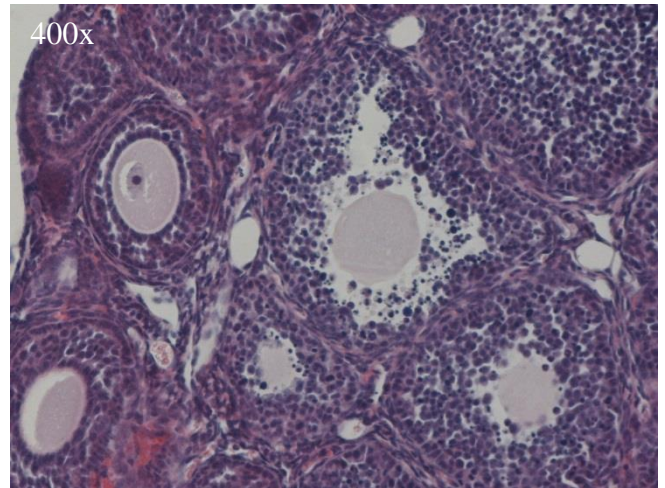
A: PND 21 – DMSO

A.ii, A.iii: Πολυάριθμα υγιή ωοθυλάκια, διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων, με διακριτό πυρήνα.

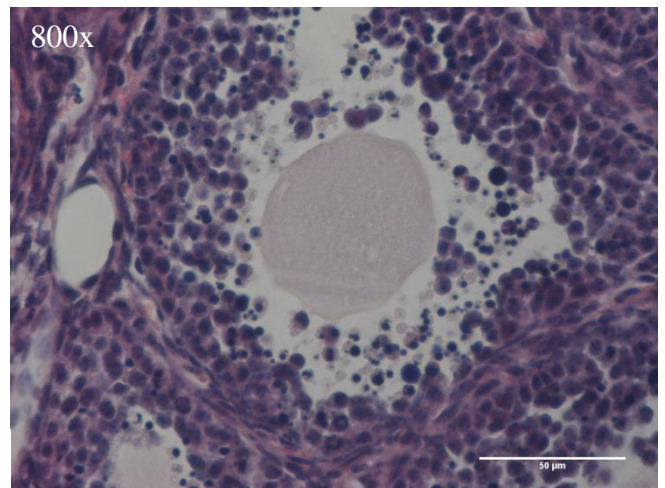
B.i



B.ii

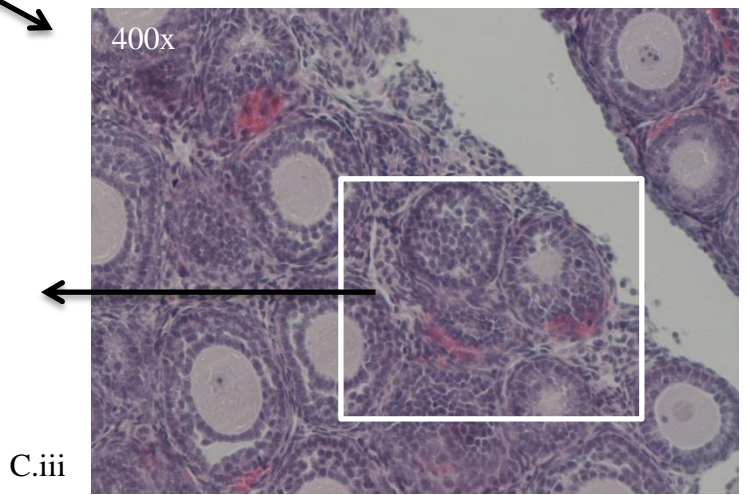
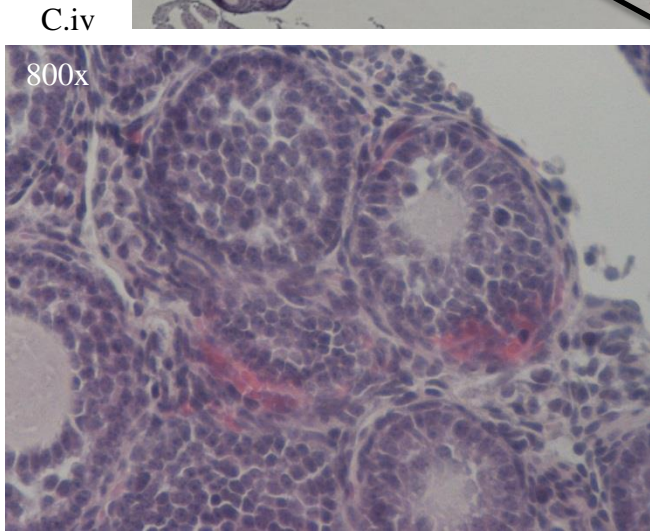
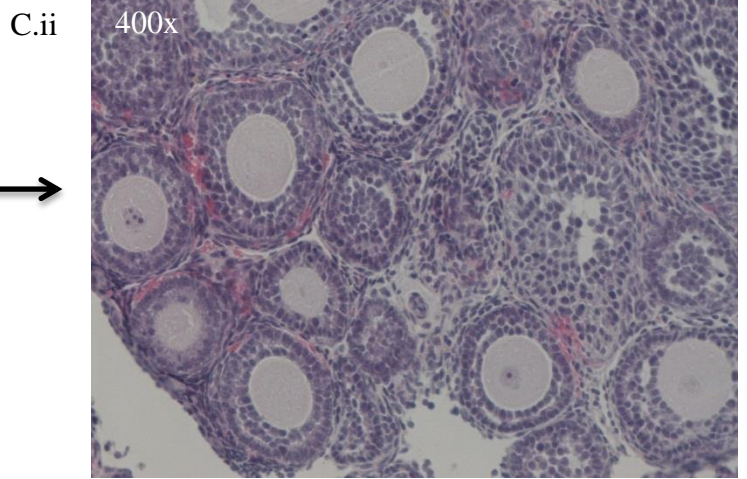
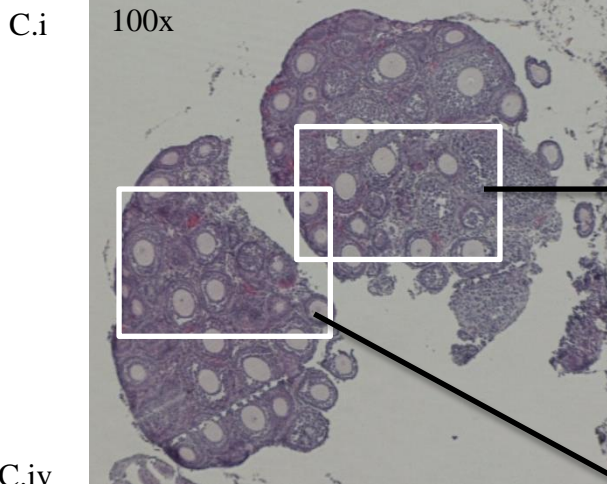


B.iii

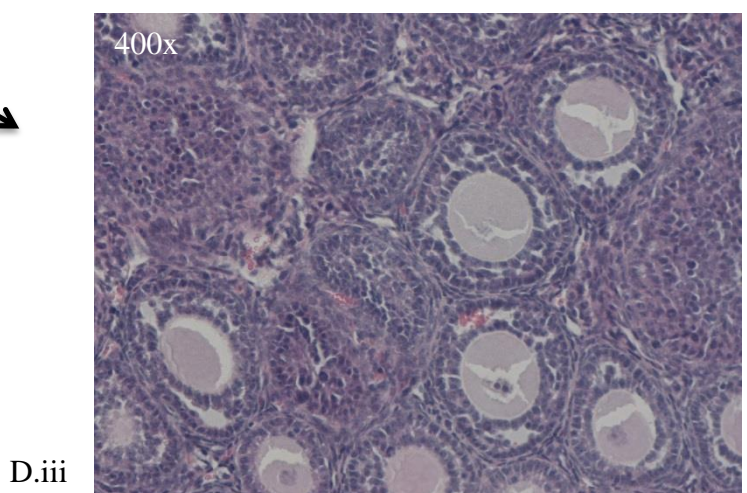
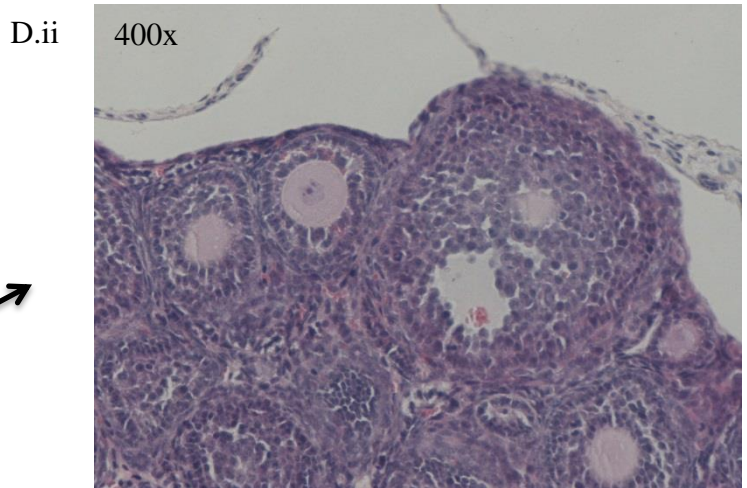
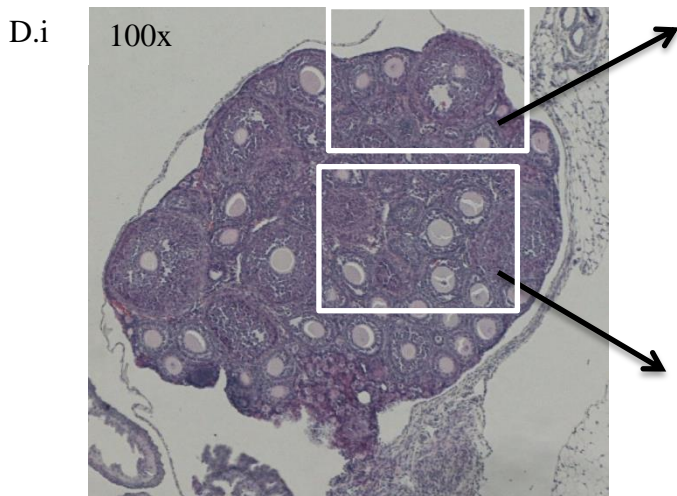


B: PND 21 – S10.

B.ii, B.iii: Ωοθυλάκια προχωρημένου αναπτυξιακού σταδίου (πολλές στιβάδες κοκκιωδών κυττάρων) στα οποία παρατηρούνται πυκνωτικοί πυρήνες και ατρητικά σωμάτια, βασικά χαρακτηριστικά εκφυλισμού.



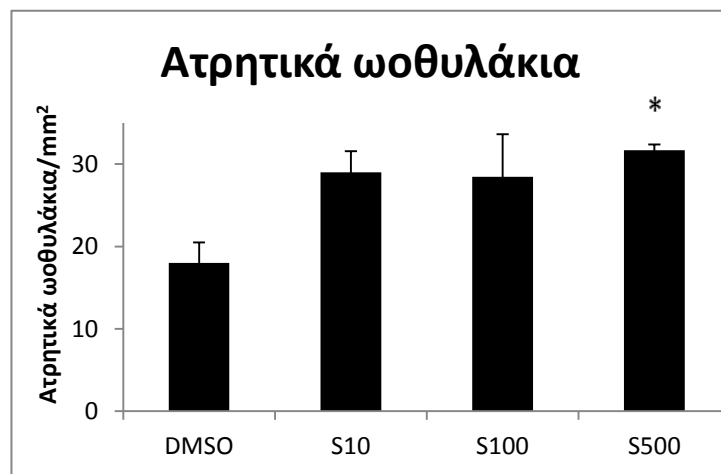
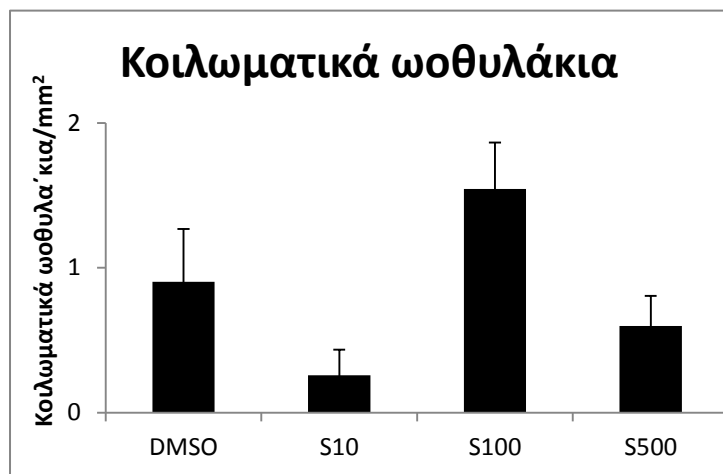
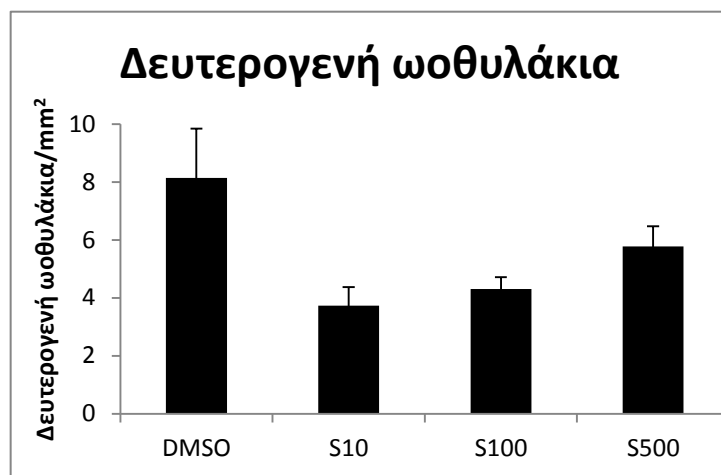
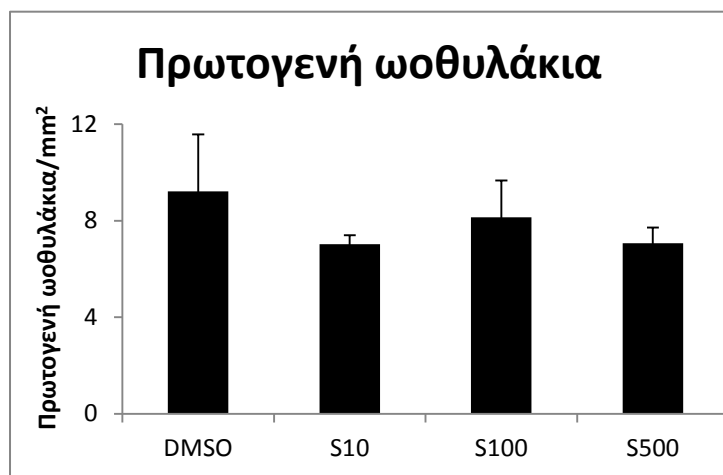
C: PND 21 – S100. C.ii, C.iii, C.iv: Ωοθυλάκια διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων μέσα στα οποία εντοπίζονται ερυθροκύτταρα.



D.iii

D: PND 21 – S500

D.ii, D.iii: Ωοθυλάκια διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων μέσα στα οποία εντοπίζονται ερυθροκύτταρα.



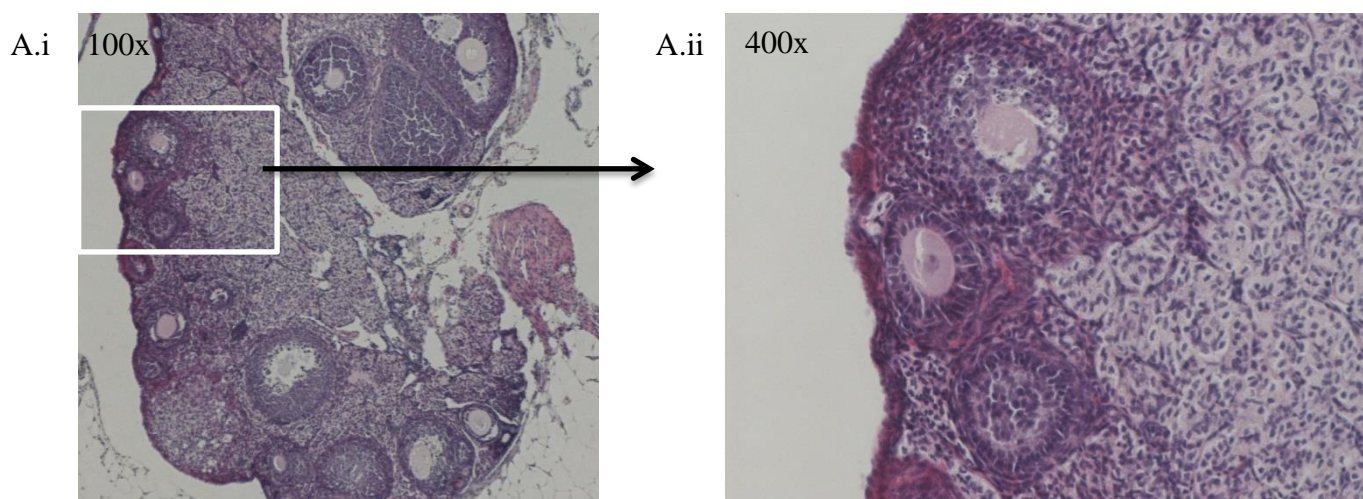
Διαγρ. 7: Επίδραση του μίγματος φθαλικών στη μορφολογία της προεφηβικής ωοθήκης την PND 21. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή του αριθμού των ωοθυλακίων κάθε αναπτυξιακού σταδίου ως προς την επιφάνεια της ωοθήκης (mm²) για κάθε ομάδα ±SEM. * στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα DMSO, *P < 0.05. Ο αριθμός των πειραματοζώων που χρησιμοποιήθηκαν στη στατιστική ανάλυση ήταν: 9 DMSO, 6 S10, 5 S100, 4 S500.

Επιπλέον, στις ωοθήκες θηλυκών μυών PND 21 παρατηρήθηκαν σε ορισμένες περιπτώσεις ωοθυλάκια τα οποία περιέκλειαν δύο ωοκύτταρα. Στο διπλανό πίνακα παρουσιάζεται το ποσοστό των ωοθηκών κάθε ομάδας στις οποίες εντοπίστηκαν τέτοιου είδους ωοθυλάκια.

Ποσοστό ωοθηκών με πολύ-ωοκυτταρικά ωοθυλάκια	
DMSO	22%
S10	17%
S100	60%
S500	50%

4.8 Μορφολογία ωοθήκης – στην ηλικία των 90 ημερών

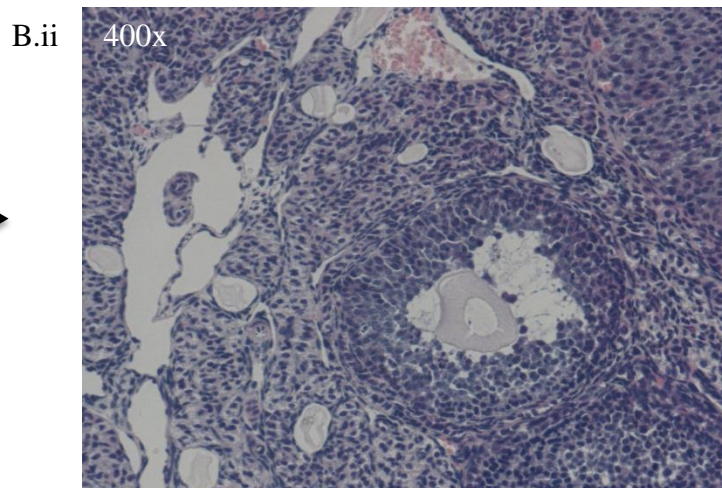
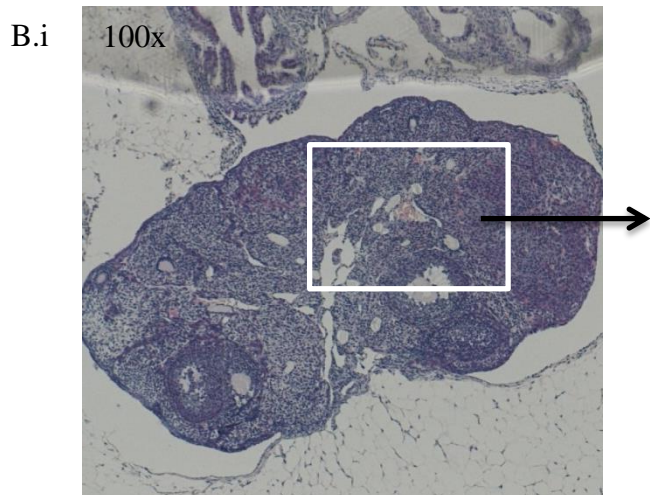
Στην ενήλικη ωοθήκη μετρήθηκαν οι εξής κατηγορίες ωοθυλακίων: πρωτογενή (primary), δευτερογενή (secondary), κοιλωματικά (antral), ωχρά σωμάτια (corpus luteum) και ατρητικά (atretic). Μετά από καταμέτρηση των ανωτέρω τύπων ωοθυλακίων και κανονικοποίηση με το εμβαδόν κάθε ωοθήκης, ακολούθησε στατιστική ανάλυση μονής διακύμανσης με εξαρτημένη μεταβλητή τον τύπο ωοθυλακίων. Βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των πρωτογενών ($F_{(3,31)}=4.041$, $p=0.017$) και των δευτερογενών ωοθυλακίων ($F_{(3,31)}=6.914$, $p=0.001$) και συγκεκριμένα μετα-ανάλυση κατά Bonferroni, έδειξε ότι η ομάδα S500 παρουσίαζε σημαντικά μικρότερο αριθμό πρωτογενών και δευτερογενών ωοθυλακίων από την ομάδα ελέγχου DMSO ($p=0.025$ και $p=0.001$, αντιστοίχως). Επιπλέον, οριακή διαφορά εμφανίστηκε και στα κοιλωματικά ωοθυλάκια ($F_{(3,24)}=3.088$, $p=0.049$) και συγκεκριμένα η ομάδα S500 είχε λιγότερα ωοθυλάκια αυτού του τύπου σε σχέση με την ομάδα S100 ($p=0.050$).



Εικόνα 10: Τομές ωοθηκών θηλυκών επίμων με χρώση αιματοξυλίνης και εωσίνης. Σε κάθε φωτογραφία σημειώνεται η συνολική μεγέθυνση που επιτεύχθηκε με το μικροσκόπιο Nikon Coolscope II που χρησιμοποιήθηκε (100x, 200x, 400x, 800x).

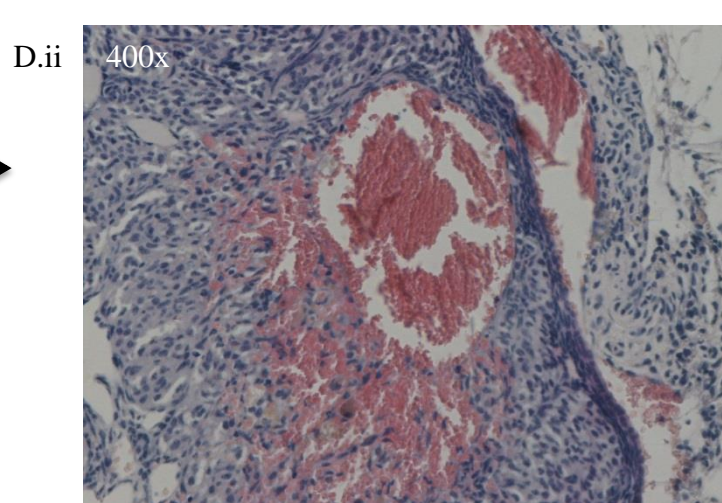
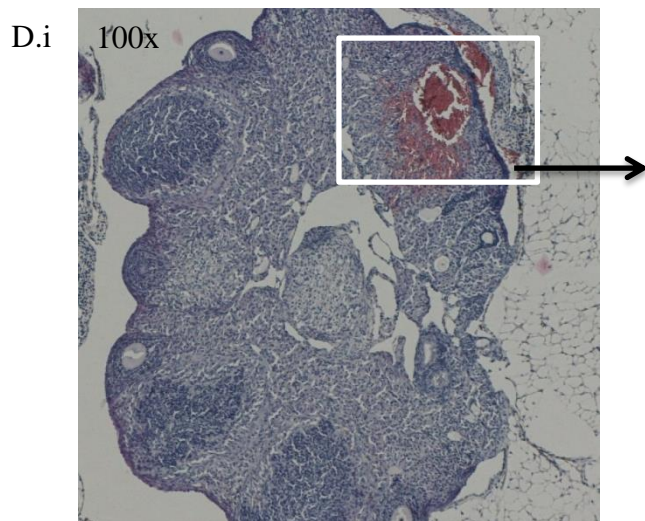
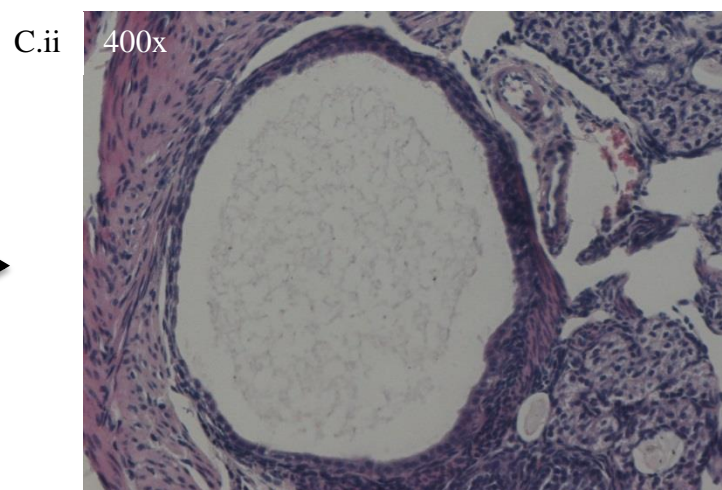
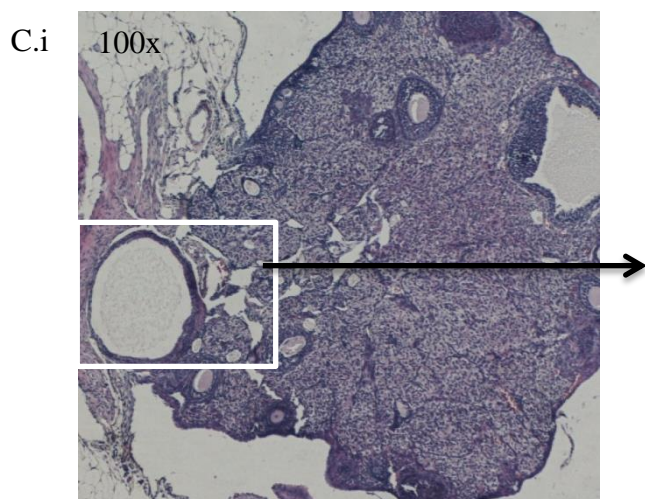
A: PND 90 – DMSO

Aii: Δευτερογενές ωοθυλάκιο με ευδιάκριτο πυρήνα και ατρητικό ωοθυλάκιο



B: PND 90 – S10

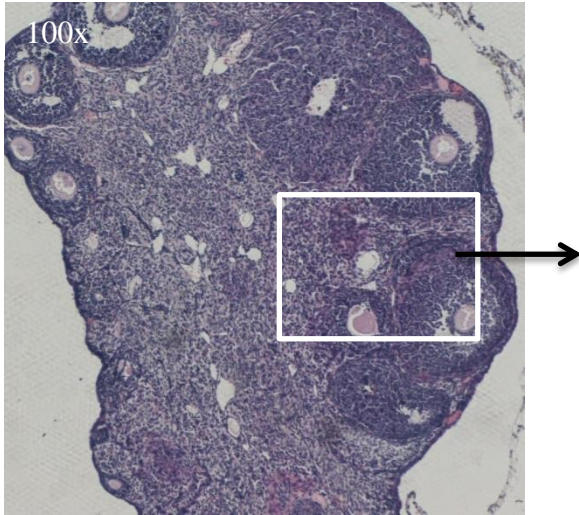
Bii: Μικρά και μεγάλα ατρητικά ωοθυλάκια



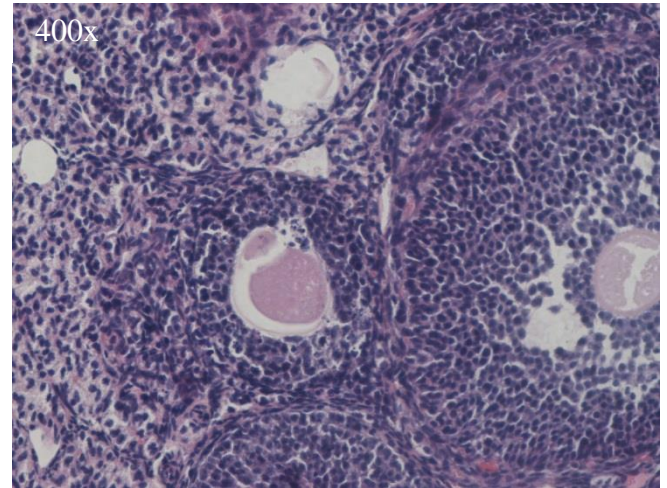
C, D: PND 90 – S100

Cii, Dii: Ωοθηκικές κύστεις χωρίς ή με ερυθρά αιμοσφαίρια, αντίστοιχα

E.i



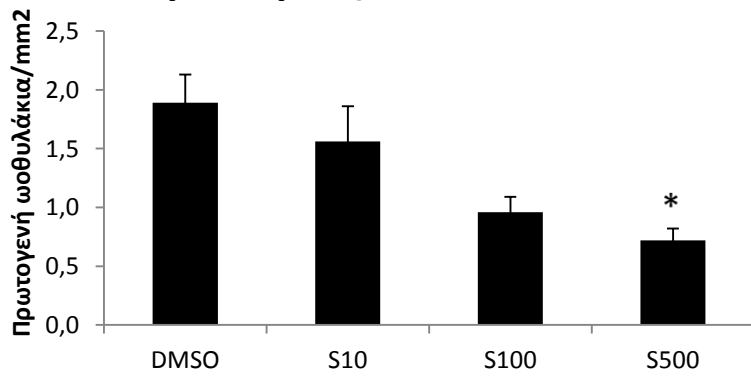
E.i



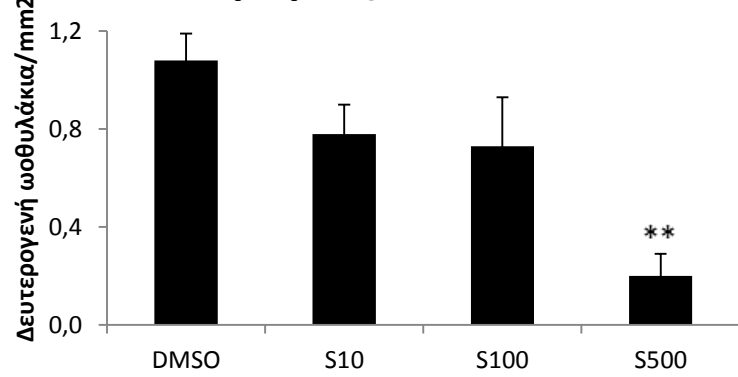
E: PND 90 – S10

Eii: Μικρά και μεγάλα ατρητικά ωοθυλάκια

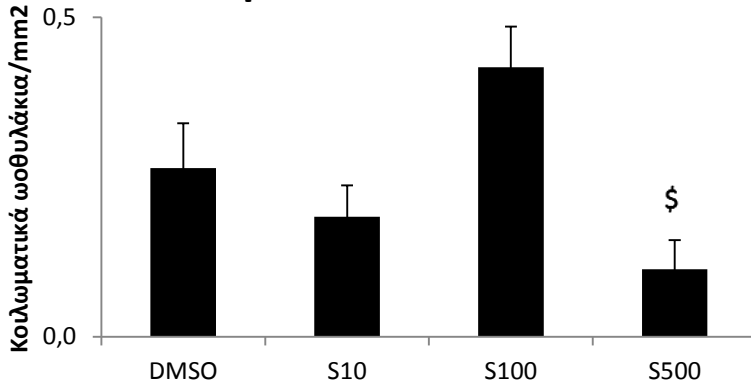
Πρωτογενή ωοθυλάκια



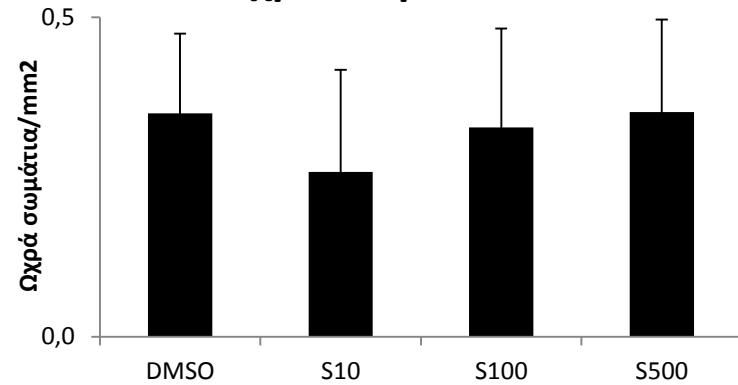
Δευτερογενή ωοθυλάκια

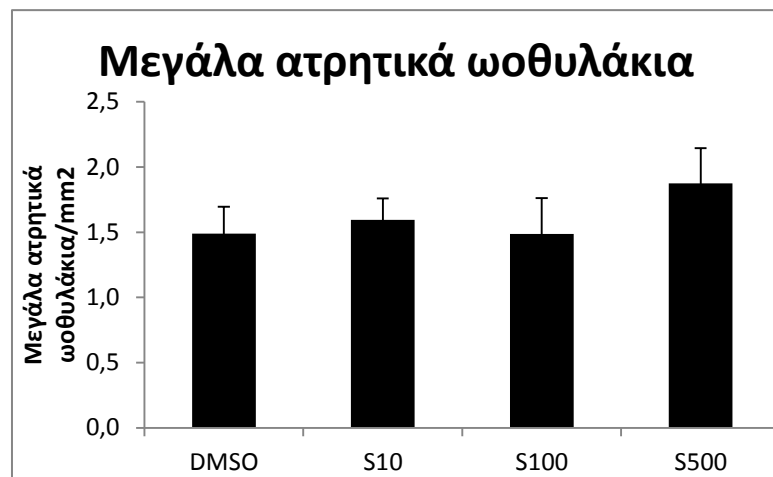
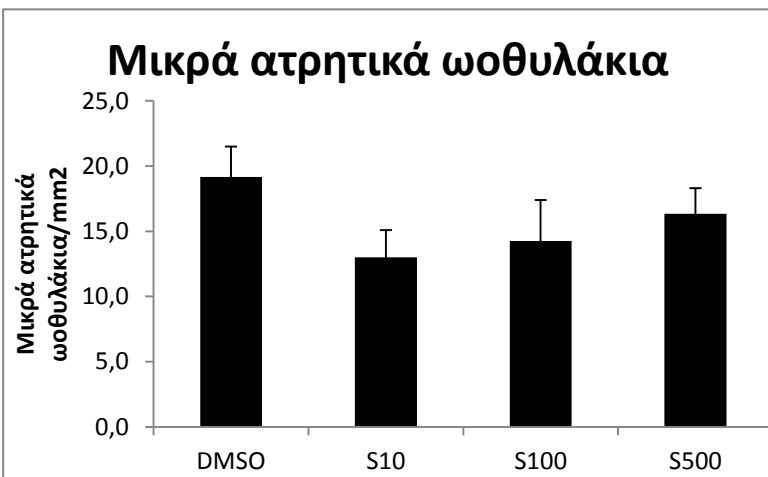


Κοιλωματικά ωοθυλάκια



Ωχρά σωμάτια





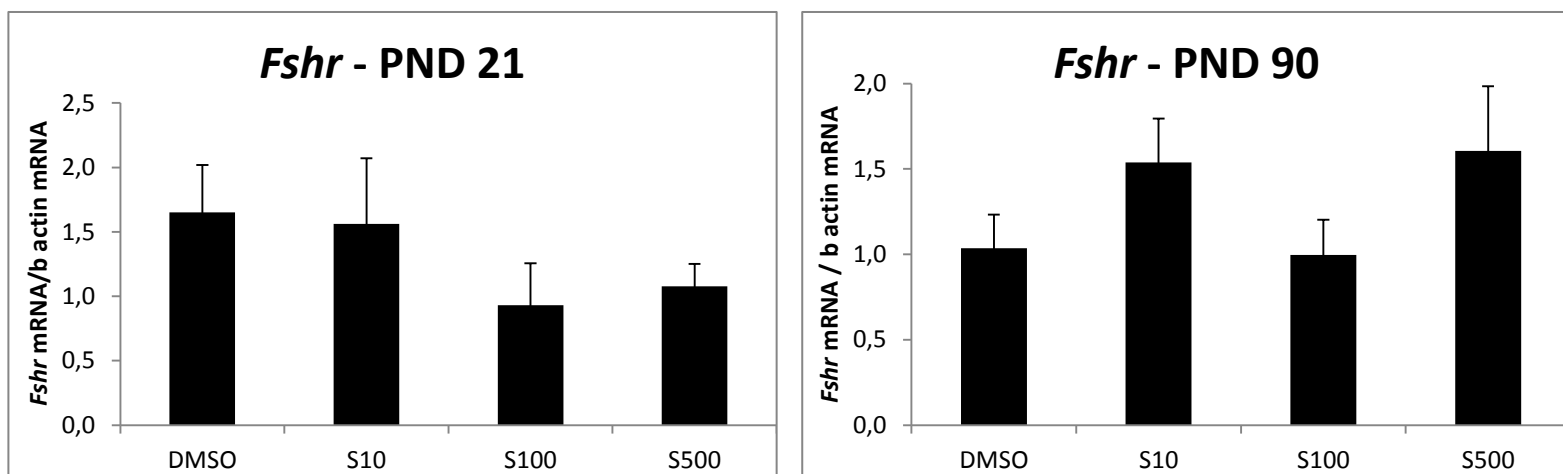
Διαγρ. 8: Επίδραση του μίγματος φθαικών στη μορφολογία της ωοθήκης την PND 90. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή του αριθμού των ωοθυλακίων κάθε αναπτυξιακού σταδίου ως προς την επιφάνεια της ωοθήκης (mm²) για κάθε ομάδα ±SEM. * στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα DMSO, *P < 0.05, **P < 0.01. \$ στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα S100, \$P < 0.05. Ο αριθμός των πειραματοζώων που χρησιμοποιήθηκαν στη στατιστική ανάλυση ήταν: 12 DMSO, 8 S10, 6 S100, 5 S500.

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι σε τρεις μύες της ομάδας S100 παρατηρήθηκαν κύστεις, χαρακτηριστικό που δεν εντοπίστηκε σε κανένα ζώο της ομάδας ελέγχου αλλά ούτε κάποιας άλλης πειραματικής ομάδας. Δύο από αυτές τις κύστεις ήταν γεμάτες με ερυθροκύτταρα (Εικόνα 11 C, D).

Αριθμός ωοθηκών με κύστεις	
DMSO	0/5
S10	0/5
S100	3/5
S500	0/5

4.9 Επίπεδα mRNA του υποδοχέα FSH (FSHR) στην ωοθήκη

Μελέτη των επιπέδων mRNA του υποδοχέα FSHR, μετά από κανονικοποίηση με τα επίπεδα mRNA της β-ακτίνης, δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ούτε στις προεφηβικές (PND 21) αλλά ούτε και στις ενήλικες (PND 90) ωοθήκες.



Διαγρ 9: Επίδραση του μίγματος φθαλικών στην έκφραση του γονιδίου για τον υποδοχέα FSHR στις ωοθήκες κατά την PND 21 και PND 90. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή του λόγου *Fshr* mRNA/*b-actin* mRNA για κάθε ομάδα \pm SEM. Ο αριθμός των πειραματοζώων που χρησιμοποιήθηκαν στη στατιστική ανάλυση ήταν: 10 DMSO, 6 S10, 5 S100, 4 S500 (PND 21); 13 DMSO, 9 S10, 9 S100, 5 S500 (PND 90).

Σύνοψη αποτελεσμάτων:

Η προγεννητική έκθεση των θηλυκών μυών στο μίγμα S των φθαλικών είχε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

- Μείωση του βάρους σώματος, την PND 21, στην ομάδα S500 σε σχέση με τις ομάδες DMSO και S10
- Αύξηση της πρωκτογεννητικής απόστασης, την PND 1, στην ομάδα S10 σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες
- Μείωση της πρωκτογεννητικής απόστασης, την PND 21, στην ομάδα S100 σε σχέση με τις ομάδες DMSO και S500
- Αύξηση του κανονικοποιημένου πρωκτογεννητικού ανοίγματος, την PND 1, στην ομάδα S10 σε σχέση με την ομάδα DMSO
- Μείωση της κανονικοποιημένης πρωκτογεννητικής απόστασης, την PND 21, στην ομάδα S10 σε σχέση με την ομάδα DMSO και αύξηση του κανονικοποιημένου AGD στην ομάδα S500 σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες
- Αύξηση του βάρους της ωθήκης, την PND 90, στην ομάδα S500 σε σχέση με την ομάδα S100
- Αύξηση του κανονικοποιημένου βάρους ωθήκης/βάρους σώματος, την PND 90, στην ομάδα S500 σε σχέση με την ομάδα S100
- Αύξηση των ατρητικών ωοθυλακίων, την PND 21, στην ομάδα S500 και παρατήρηση περισσότερων ωοθηκών με πολυωοκυτταρικά ωοθυλάκια στις ομάδες S100 και S500 σε σχέση με την ομάδα DMSO
- Μείωση των πρωτογενών και των δευτερογενών ωοθυλακίων, την PND 90, στην ομάδα S500 σε σχέση με την ομάδα DMSO και παρατήρηση ωοθηκικών κύστεων στην ομάδα S10

Μέτρηση	Ηλικία	S10	S100	S500
Βάρος σώματος	PND 1	-	-	-
	PND 21	-	-	↑
	PND 90	-	-	-
AGD	PND 1	↑	-	-
	PND 21	-	↓	-
	PND 90	-	-	-
AGD/βάρος σώματος	PND 1	↑	-	-
	PND 21	↓	-	↑
	PND 90	-	-	-
Μορφολογία ωοθηκών				
	Ατρητικά ωοθυλάκια	PND 21	-	-
Πρωτογενή ωοθυλάκια	PND 90	-	-	↓
Δευτερογενή ωοθυλάκια	PND 90	-	-	↓

Πίνακας 1: Πίνακας διαφορών των πειραματικών ομάδων με την ομάδα ελέγχου (DMSO).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι φθαλικές ενώσεις αποτελούν βασικό συστατικό για την κατασκευή πλαστικών και καλλυντικών, με αποτέλεσμα να συναντώνται σε πολυάριθμα καταναλωτικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται ευρέως στην καθημερινή μας ζωή. Οι χημικές αυτές ενώσεις, μπορούν εύκολα να απελευθερωθούν στο περιβάλλον και να εισέλθουν στον οργανισμό μέσω κατάποσης, εισπνοής και απορρόφησης από το δέρμα. Πολυάριθμες επιστημονικές μελέτες έχουν δείξει ότι η έκθεση σε φθαλικές ενώσεις έχει σημαντικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγική ικανότητα των οργανισμών. Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες, όμως, έχουν περιοριστεί στη μελέτη μεμονωμένων φθαλικών ενώσεων, κάτι που αποκλίνει από την πραγματική καθημερινή έκθεση του ανθρώπου. Επιπλέον, η πλειοψηφία των μελετών έχει επικεντρωθεί στην παρατήρηση των επιπτώσεων στο αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα, παρόλο που οι γυναίκες εκτίθενται περισσότερο από τους άνδρες σε καθημερινή βάση. Για τους παραπάνω λόγους, θεωρήθηκε σημαντικό η παρούσα εργασία να εστιάσει στη μελέτη της επίδρασης μίγματος φθαλικών ενώσεων στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα, μετά από έκθεση σε μία πολύ σημαντική αναπτυξιακή περίοδο, αυτή της ενδομήτριας ζωής.

Συνοπτικά, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η έκθεση σε μίγμα φθαλικών ενώσεων κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, προκαλεί διαφορές στο βάρος σώματος και το δείκτη πρωκτογεννητικής απόστασης AGD. Επιπλέον, στην ωοθήκη, παρατηρήθηκε αυξημένη ωοθυλακική ατρησία κατά την προεφηβεία, με αποτέλεσμα τη μείωση των υγείων προκοιλωματικών ωοθυλακίων κατά την ενηλικίωση, στα ζώα που είχαν εκτεθεί προγεννητικά. Επιπτώσεις από την έκθεση παρατηρούνται σε όλες τις δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν, υποστηρίζοντας για ακόμη μία φορά το διαπιστωμένο μη μονοτονικό τρόπο δράσης των φθαλικών ενώσεων και την ανάγκη για συνέχιση των μελετών σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων.

Πιο αναλυτικά, με βάση τα αποτελέσματά μας, *in utero* έκθεση στο μίγμα των φθαλικών είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του βάρους σώματος των θηλυκών μυών την 21^η μεταγεννητική ημέρα (PND 21) στην ομάδα S500 (με την υψηλότερη έκθεση), ένα εύρημα που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες των επιπτώσεων μεμονωμένων φθαλικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, η Pocar και οι συνεργάτες της έδειξαν πως έκθεση μυών σε DEHP κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, μειώνει το βάρος των θηλυκών απογόνων την PND 21, ενώ αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα της Niermann και των συνεργατών της τις PND 8 και PND 60 (Pocard et al., 2012; Niermann et al., 2015). Από την άλλη, το βάρος των θηλυκών απογόνων δε φάνηκε να επηρεάζεται σε άλλες μελέτες, μετά από *in utero* έκθεση σε μίγμα φθαλικών (Zhou et al., 2017). Ίσως η διαφορά των αποτελεσμάτων με την τελευταία μελέτη, έγκειται στη διαφορετική περίοδο έκθεσης των εμβρύων στο μίγμα, καθώς η χορήγησή του πραγματοποιούνταν από τη 10^η ημέρα της κύησης μέχρι τη γέννηση, σε αντίθεση με τη δική μας, όπου η έκθεση ξεκινούσε από την αρχή της εγκυμοσύνης, αλλά και στη διαφορετική σύσταση των μειγμάτων.

Μείωση του βάρους σώματος έχει παρατηρηθεί και σε επίμυες έπειτα από *in utero* έκθεση σε μεμονωμένους φθαλικούς διαστέρες του μίγματός μας όπως το BBzP και

το DINP (Nagao et al., 2000; Waterman et al., 2000; Masutomi et al., 2003), ενώ παρόμοιες παρατηρήσεις προκύπτουν και από επιδημιολογικές μελέτες όπου η *in utero* έκθεση σε φθαλικές ενώσεις συσχετίζεται με μικρότερο βάρος σώματος και ύψος και χαμηλότερα επίπεδα αυξητικών ορμονών (π.χ. IGF-1) (Tsai et al. 2016), με υψηλότερα επίπεδα λεπτίνης, μίας ορμόνης που ελέγχει την ποσότητα λίπους που αποθηκεύεται στο σώμα (Ashley-Martin et al. 2014), με χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης (Perng et al. 2017) και μεταβολικές δυσλειτουργίες (Tran et al. 2016).

Τα αποτελέσματά μας ως προς το δείκτη AGD, ένα πρώιμο δείκτη διαφοροποίησης του φύλου (που φυσιολογικά εμφανίζεται μεγαλύτερος στα αρσενικά και μικρότερος στα θηλυκά άτομα), έδειξαν αύξησή του κατά τη νεογνική ηλικία (PND 1) στην ομάδα S10, μείωση κατά την προεφηβεία (PND 21) στην ομάδα S100, ενώ δεν παρουσιάστηκε καμία διαφορά μεταξύ των ομάδων κατά την ενήλικη ζωή (PND 90). Τα ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και μετά από κανονικοποίηση του AGD με το βάρος σώματος, με επιπλέον εύρημα την αύξηση του λόγου AGD/βάρος σώματος την PND 21 στη μεγαλύτερη δόση (S500). Οι παρατηρήσεις αυτές, υποδηλώνουν μία πιθανή ανδρογονική δράση των φθαλικών ενώσεων που μελετήθηκαν.

Τα παραπάνω αποτελέσματα, συμφωνούν, εν μέρει, με τα πειράματα της Zhou και των συνεργατών της, στα οποία το AGD φάνηκε να μειώνεται την PND 8 και την PND 60. Στην ίδια μελέτη το AGD δε φάνηκε να παρουσιάζει καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων κατά την προεφηβεία (PND 21) και την προχωρημένη ενήλικη ζωή (13 μήνες) (Zhou et al., 2017a). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι παρατηρήσεις της ίδιας ερευνητικής ομάδας σε επόμενες γενεές μυών, έδειξαν επίσης μείωση του AGD την PND 8 στην F2 γενιά, αλλά και την PND 21 στην F2 και F3 γενιά (Zhou et al., 2017b). Από την άλλη, αντίστοιχες μελέτες σε επίμυες επιβεβαιώνουν τις παρατηρήσεις μας ως προς την αύξηση του AGD την PND 1, μετά από *in utero* έκθεση σε DBP ή DINP (Lee et al., 2006).

Παρόλα αυτά, η απουσία σημαντικών διαφορών στο AGD αλλά και στο βάρος σώματος μεταξύ των ομάδων μετά την ενηλικίωση, υποδηλώνει την ύπαρξη αντισταθμιστικών μηχανισμών, πιθανόν μέσω δράσης των ορμονών του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης – γονάδων, οι οποίοι εξομαλύνουν τις παρατηρούμενες διαφορές με την πάροδο του χρόνου.

Όσον αφορά στο βάρος των ωοθηκών που μετρήθηκε κατά την προεφηβεία (PND 21) και την ενήλικη ζωή (PND 90), αυτό δε βρέθηκε να επηρεάζεται από την *in utero* έκθεση στο μίγμα που χρησιμοποιήσαμε. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με αντίστοιχες μελέτες σε μυς οι οποίες εξέτασαν την επίδραση είτε μεμονωμένων φθαλικών ενώσεων (Wang et al., 2016), είτε μειγμάτων τους (Zhou et al., 2017a) σε θηλυκούς απογόνους μετά από *in utero* έκθεση και καταμέτρηση σε αντίστοιχες ηλικίες. Παρόλα αυτά, μειωμένο βάρος ωοθηκών έχει παρατηρηθεί σε άλλες μελέτες μυών (Nierman et al., 2015) και επίμυων (Nagao et al., 2000; Masutomi et al., 2003; Kay et al., 2013). Οι διαφορές αυτές, είναι πιθανόν να οφείλονται στη διαφορετική περίοδο έκθεσης, στις διαφορετικές χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις, στη μελέτη μεμονωμένων φθαλικών ενώσεων καθώς και στο διαφορετικό είδος πειραματοζώου που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση.

Το μίγμα των φθαλικών εστέρων δε φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την έναρξη της εφηβείας, μία φάση που στα θηλυκά τρωκτικά σηματοδοτείται από το άνοιγμα του κόλπου (Vaginal Opening, VO). Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζονται κι από άλλες αντίστοιχες μελέτες όπου η in utero έκθεση σε μεμονωμένα φθαλικά όπως το DEHP (Moyer and Hixon, 2012; Nierman et al., 2015) ή σε μίγματα φθαλικών (Zhou et al., 2017a), δε φάνηκε να τροποποιεί την ηλικία διάνοιξης του κόλπου. Όσον αφορά την επίδραση άλλων μεμονωμένων φθαλικών ενώσεων του μίγματός μας, μελέτες σε επίμυες έδειξαν ότι in utero έκθεση σε DINP δεν επηρεάζει την ηλικία του VO (Masutomi et al., 2003), ενώ αντίστοιχες μελέτες επίδρασης του BBzP εμφανίζουν πιο αντικρουόμενα αποτελέσματα, με αύξηση, μείωση ή καμία διαφοροποίηση της ηλικίας διάνοιξης του κόλπου, ανάλογα με τη δόση που μελετάται κάθε φορά, τον τρόπο αλλά και το χρόνο έκθεσης της μητέρας (Ashby et al., 1997; Nagao et al., 2000; Tyl et al., 2004; Moral et al., 2004; Aso et al., 2005).

Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στη μελέτη μας ύστερα από μορφομετρική μελέτη των ωθηκών. Μετρήσεις των διαφορετικών τύπων ωοθυλακίων έδειξαν ότι τα ατρητικά ωοθυλάκια ήταν σημαντικά αυξημένα στην ομάδα S500, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, κατά την προεφηβεία (PND 21). Αύξηση των ατρητικών ωοθυλακίων την PND 21 είχε επίσης παρατηρήσει η ομάδα της Wang μετά από in utero έκθεση σε DEHP. Αυτή η αύξηση παρατηρήθηκε σε όλες τις ομάδες πειραματοζώων που είχαν εκτεθεί σε DEHP (2, 20 και 200 mg/kg/d) και ακολουθούσε αναλογικά την αύξηση των χρησιμοποιούμενων δόσεων (Wang et al., 2016).

Ευρήματα από ενήλικους μυς συνδέουν επίσης τις φθαλικές ενώσεις με την ωοθυλακική ατρησία, είτε μετά από μελέτη ολόκληρων ωοθυλακίων, είτε μετά από καλλιέργεια μεμονωμένων ωοκυττάρων. Οι μελέτες αυτές, συνδέουν την αύξηση της ατρησίας κατά την προεφηβεία και την ενήλικη ζωή, με τη συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), την αύξηση της έκφρασης προ-αποπτωτικών γονιδίων, τη μείωση της έκφρασης αντι-αποπτωτικών γονιδίων, καθώς και με την παρεμπόδιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής ωρίμανσης, επηρεάζοντας την έκφραση διαφόρων κυκλινών (Dalman et al., 2008; Gupta et al., 2010; Wang et al., 2012; Craig et al., 2013; 2014; Sen et al., 2015; Li et al., 2016). Εκτός, όμως, από τα παραπάνω, σημαντικό αίτιο φαίνεται να αποτελεί και η μείωση της οιστραδιόλης (E2) η οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των ωοθυλακίων. Σύμφωνα με ποικίλες πειραματικές μελέτες, η μείωση της E2 φαίνεται να οφείλεται στη μείωση της έκφρασης πολύ σημαντικών ενζύμων της ωοθηκικής στεροειδογένεσης (StAR, CYP17A1, CYP19A1) και στην τροποποίηση της φυσιολογικής ενδοκυτταρικής σηματοδότησης μέσω των υποδοχέων PPAR (Gupta et al., 2010; Pocar et al., 2012; Hannon et al., 2015). Παράλληλα, η αλλαγή της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των κοκκιωδών κυττάρων, όπως το Foxl2, αλλά και γονιδίων που επηρεάζουν τη φυσιολογική σηματοδότηση μέσω του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης – γονάδων, διαταράσσουν την ωοθυλακική ανάπτυξη και επάγουν την ατρησία, κάτι που έχει συσχετισθεί με μειωμένη αναπαραγωγική ζωή και πρόωμη εμφάνιση ωοθηκικής ανεπάρκειας (Moyer and Hixon, 2012; Wang et al., 2016).

Ένα ακόμη εύρημα της μελέτης μας στην προεφηβική ωοθήκη, ήταν το αυξημένο ποσοστό μυών με ωοθυλάκια που περιελάμβαναν δύο ωοκύτταρα (polyovular follicles – POFs) στις ομάδες S100 και S500, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ωοθυλάκια με πολλαπλά ωοκύτταρα έχουν παρατηρηθεί σε μυς μετά από προγεννητική και περιγεννητική έκθεση σε οιστρογονικά ανάλογα, όπως για παράδειγμα η διεθυλστιλβεστρόλη (DES) και η γενιστεΐνη (Iguchi et al., 1986; Jefferson et al., 2002; Alm et al., 2010), μετά από μεταλλάξεις γονιδίων της οικογένειας TGFβ (McMullen et al., 2001) ή μετά από τροποποιημένη σηματοδότηση Notch (Hahn et al., 2005). Κατά τη φυσιολογική εμβρυική και πρώιμη μεταγεννητική ανάπτυξη της ωοθήκης, τα δημιουργούμενα ωοθυλάκια περιλαμβάνουν περισσότερα από ένα ωοκύτταρα, κάποια από τα οποία εκφυλίζονται με αποτέλεσμα κάθε ωοθυλάκιο να περιέχει τελικά μόνο ένα γαμετικό κύτταρο. Η διαδικασία αυτή εξαρτάται από την αναλογία ωοκυττάρων και σωματικών κυττάρων, καθώς και από τη λήψη κατάλληλων σημάτων για τη σωστή διάρρηξη των «φωλεών» γαμετικών κυττάρων και την κυτταρική απόπτωση (Kim et al., 2009; Alm et al., 2010). Ίσως, λοιπόν, τα ευρήματά μας να υποδεικνύουν κάποια τροποποιημένη σηματοδότηση στην εμβρυική ωοθήκη, παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν αντίστοιχα ευρήματα στη βιβλιογραφία που να συσχετίζονται με τις φθαλικές ενώσεις.

Οι μετρήσεις μας στις ωοθήκες θηλυκών μυών κατά την ενήλικη ζωή (PND 90) έδειξαν μειωμένο αριθμό πρωτογενών και δευτερογενών ωοθυλακίων στην ομάδα S500. Το εύρημα αυτό σχετίζεται άμεσα με τα αυξημένα επίπεδα ατρησίας που παρατηρήσαμε στην ίδια πειραματική ομάδα κατά την προεφηβεία, ενώ αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν βρεθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες. Ένα παράδειγμα αποτελεί η ομάδα της Sen και των συνεργατών της, σύμφωνα με την οποία ο φθαλικός εστέρας DBP προκαλεί μείωση των δευτερογενών ωοθυλακίων στην ενήλικη ωοθήκη και αύξηση της έκφρασης προ-αποπτωτικών γονιδίων (Sen et al., 2015). Μάλιστα οι συγκεντρώσεις του φθαλικού που μελέτησαν οι εν λόγω ερευνητές, προσομοίαζαν εκείνες στις οποίες εκτίθεται ο άνθρωπος στην καθημερινή του ζωή. Η μείωση των προκοιλωματικών ωοθυλακίων στις ενήλικες ωοθήκες, ισοδυναμεί με μείωση των διαθέσιμων ωοθυλακίων για μελλοντική ωορρηξία, κάτι που συμφωνεί με τις παρατηρήσεις άλλων ερευνητών ως προς την εμφάνιση πρώιμης ωοθηκικής ανεπάρκειας (Moyer and Hixon, 2012; Wang et al., 2016).

Μία ακόμη παρατήρηση που έγινε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ήταν και η εύρεση ωοθηκικών κύστεων στις ωοθήκες των ενήλικων μυών της ομάδας S100, ένα φαινόμενο που δεν παρατηρήθηκε σε καμία άλλη πειραματική ομάδα αλλά ούτε και στην ομάδα ελέγχου. Η εύρεση κύστεων συνάδει με παρατηρήσεις που έκαναν η Zhou και οι συνεργάτες της, σύμφωνα με τις οποίες θηλυκοί μύες που είχαν εκτεθεί *in utero* σε διάφορες δόσεις μίγματος φθαλικών ενώσεων, παρουσίασαν επίσης κυστικές ωοθήκες κατά την ενήλικη ζωή και συγκεκριμένα σε ηλικία 13 μηνών. Αντιθέτως, καμία κύστη δεν παρατηρήθηκε σε ωοθήκες μυών της ομάδας ελέγχου (Zhou et al., 2017a). Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα της ίδιας ομάδας σε μυς 13 μηνών της F2 γενιάς, κάτι που δείχνει ότι η επίδραση των φθαλικών δύναται να επηρεάσει το αναπαραγωγικό σύστημα και των επόμενων γενεών (Zhou et al., 2017b). Η παρουσία κύστεων έχει θεωρηθεί αρκετές φορές ως ένδειξη

αναπαραγωγικής γήρανσης (Creasy and Mann, 2012). Παρόμοιοι φαινότυποι έχουν παρατηρηθεί σε διάφορα πειραματικά μοντέλα μυών, όπως για παράδειγμα σε θηλυκούς μυς προχωρημένης ηλικίας που εμφάνιζαν μικρές ωοθηκικές κύστες από την ηλικία των 6 μηνών, ενώ στους 9 μήνες παρουσίαζαν πλέον κύστες μεγάλου μεγέθους (Fleming et al., 2007).

Στη μελέτη μας, ωοθηκικές κύστες παρατηρήθηκαν μόνο σε θηλυκούς μυς που είχαν εκτεθεί προγεννητικά στο μίγμα των φθαλικών ενώσεων. Επομένως, σύμφωνα με τα συνολικά ευρήματά μας, αλλά και με τις μελέτες που προαναφέρθηκαν, μπορούμε να πούμε ότι η παρουσία τους αποτελεί επίσης ένα σημάδι ωοθηκικής γήρανσης που προκαλείται από τους συγκεκριμένους ενδοκρινικούς διαταράκτες. Το γεγονός ότι στις ωοθήκες των ενήλικων μυών που μελετήσαμε δεν παρατηρούνταν κύστες μακροσκοπικά, παρά μόνο μετά από ιστολογική μελέτη, ίσως σχετίζεται με το νεαρό της ηλικίας. Αν αναλογιστούμε ότι οι μελέτες της Zhou και των συνεργατών της πραγματοποιήθηκαν σε μυς ηλικίας 13 μηνών, ίσως οι δικές μας παρατηρήσεις σε μυς ηλικίας 3 μηνών αποτελούν ένα πιο αρχικό εύρημα, με δυνατότητα εξέλιξης σε έναν περισσότερο παθολογικό φαινότυπο με το πέρασμα του χρόνου.

Τέλος, όσον αφορά στην έκφραση του γονιδίου *Fshr* σε ωοθήκες μυών ηλικίας 21 και 90 ημερών, δε βρέθηκε καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των πειραματικών ομάδων και της ομάδας ελέγχου. Αποτελέσματα από μελέτες μεμονωμένων φθαλικών ενώσεων, παρουσιάζουν πολύ συχνά μείωση της έκφρασης υποδοχέων ορμονών όπως αυτών της FSH, της LH και της προγεστερόνης, συνδέοντάς τη με τη μη φυσιολογική σηματοδότηση των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων, τον αυξημένο εκφυλισμό τους αλλά και τη μείωση της παραγωγής στεροειδών ορμονών (Moyer and Hixon, 2012; Zhang et al., 2015; Pocar et al., 2017). Παρόλα αυτά, τα δικά μας αποτελέσματα διαφέρουν από τα παραπάνω, ίσως λόγω του ότι μελετήσαμε μίγμα φθαλικών αντί για μεμονωμένες ενώσεις, αλλά και διότι κάποιες από τις παρατηρήσεις που προαναφέρθηκαν έγιναν μετά από *in vitro* καλλιέργεια ωοθυλακίων ή κοκκιωδών κυττάρων παρουσία ενδοκρινικών διαταρακτών, σε αντίθεση με τη δική μας μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ωοθήκες ζώων που είχαν εκτεθεί *in utero*.

Συνοπτικά, σύμφωνα με την παρούσα μελέτη, η έκθεση σε μίγμα φθαλικών ενώσεων κατά την διάρκεια της εμβρυικής ζωής, προκαλεί σημαντικές αλλαγές στο αναπαραγωγικό σύστημα των θηλυκών μυών που γίνονται εμφανείς από τις πρώτες ημέρες μετά τη γέννηση, αλλά και στην ενήλικη ζωή των πειραματοζώων. Οι παρατηρήσεις μας έρχονται σε συμφωνία με πολυάριθμες μελέτες μεμονωμένων φθαλικών ενώσεων, οι οποίες συνδέουν τις ενώσεις αυτές με αναπαραγωγικές δυσλειτουργίες και ασθένειες όπως η πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια. Συμπεραίνουμε, επομένως, ότι *in utero* έκθεση σε μίγμα φθαλικών εστέρων επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην ανάπτυξη αλλά και το αναπαραγωγικό δυναμικό των θηλυκών μυών. Τα ευρήματα αυτά μπορούν να δώσουν κάποιες απαντήσεις σε ερωτήματα που σχετίζονται με την επίδραση των φθαλικών στην υγεία του ανθρώπου, οποιαδήποτε όμως αναγωγή από τα πειραματόζωα στον άνθρωπο πρέπει να γίνεται πάντοτε με ιδιαίτερη επιφύλαξη και να συνοδεύεται από εμπειριστατωμένες επιδημιολογικές μελέτες.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες είναι εξωγενείς χημικές ενώσεις που μπορούν να εισέλθουν στον οργανισμό και να παρέμβουν στη φυσιολογική λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος. Σε αυτούς ανήκουν οι φθαλικοί εστέρες, ενώσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως στην κατασκευή πλαστικών και καλλυντικών προϊόντων και φαίνεται να εμπλέκονται στην εμφάνιση διαφόρων παθολογιών. Μεταξύ των στόχων των φθαλικών ενώσεων, βρίσκεται το αναπαραγωγικό σύστημα το οποίο είναι υπεύθυνο για πολλές βασικές διαδικασίες της φυσιολογίας, όπως η παραγωγή γαμετών και η σύνθεση και έκκριση στεροειδών ορμονών.

Η βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών δράσης των φθαλικών ενώσεων αποτελεί έναν από τους πολυάριθμους στόχους του Προγράμματος EDC-MixRisk, στο οποίο ερευνητές από την Ευρώπη και την Αμερική, συνεργάζονται με στόχο την εξασφάλιση ασφαλέστερων συνθηκών διαβίωσης για τις επόμενες γενιές. Το εργαστήριο Βασικών Ιατροβιολογικών Επιστημών του Τμήματος Οδοντιατρικής του ΕΚΠΑ, συμμετέχει (partner) στη διεθνή ερευνητική ομάδα του Προγράμματος EDC-MixRisk μελετώντας τις επιπτώσεις της πρώιμης έκθεσης σε μίγματα ενδοκρινικών διαταρακτών σε μύες.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η επίδραση μίγματος φθαλικών εστέρων (S0) στο αναπαραγωγικό σύστημα προεφηβικών και ενήλικων θηλυκών μυών, μετά από ενδομήτρια έκθεση. Στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν μίγματα δόσεων οι οποίες αντιστοιχούν σε x10, x100 και x500 επίπεδα ανθρώπινης έκθεσης, όπως αυτά προσδιορίστηκαν στην επιδημιολογική μελέτη SELMA.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, εξετάστηκαν αρχικά βασικές παράμετροι που φαίνεται να επηρεάζονται από την ενδομήτρια έκθεση σε μίγματα φθαλικών εστέρων. Αυτές περιελάμβαναν το βάρος σώματος σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης, την πρωκτογεννητική απόσταση (anogenital distance – AGD) καθώς και την είσοδο στην εφηβεία, η οποία σηματοδοτείται με τη διάνοιξη του κόλπου (vaginal opening). Επιπλέον, προκειμένου να μελετηθούν περαιτέρω οι επιδράσεις του μίγματος S0 στο βασικό όργανο του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος, την ωοθήκη, πραγματοποιήθηκαν μορφομετρικές, ιστολογικές και βιοχημικές μελέτες σε προεφηβικές και ενήλικες ωοθήκες. Στόχος ήταν ο προσδιορισμός του αριθμού και της μορφολογίας των ωοθυλακίων, καθώς και τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα FSHR ο οποίος διαμεσολαβεί τη σηματοδότηση μίας πολύ βασικής ορμόνης του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος, της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH).

Τα αποτελέσματα της εργασίας υποδεικνύουν ότι η έκθεση θηλυκών μυών σε μίγμα φθαλικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ζωής, προκαλεί μείωση του βάρους σώματος στην προεφηβεία και τροποποιήσεις της πρωκτογεννητικής απόστασης στην πρώιμη μεταγεννητική ζωή και την προεφηβεία. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι οι φθαλικοί εστέρες παρεμβαίνουν τόσο στη σωστή λειτουργία του μεταβολισμού όσο και στη φυσιολογική ανάπτυξη χαρακτηριστικών του φύλου. Από την άλλη, δε φάνηκε να τροποποιούν την ηλικία εισόδου στην εφηβεία, έναν δείκτη που έχει δειχθεί ότι επηρεάζεται από άλλους ενδοκρινικούς διαταράκτες.

Όσον αφορά στην ωοθήκη, παρόλο που εξωτερικοί παράμετροι όπως το βάρος δε φάνηκε να αλλάζουν ως αποτέλεσμα της έκθεσης στο συγκεκριμένο μίγμα φθαλικών ενώσεων, η εσωτερική μορφολογία της επηρεάστηκε σημαντικά. Πιο συγκεκριμένα, μορφομετρική εξέταση τομών προεφηβικών ωοθηκών, έδειξε αυξημένο αριθμό ατρητικών ωοθυλακίων. Η σημασία της αυξημένης ατρησίας φάνηκε κατά την εξέταση των ενήλικων ωοθηκών, όπου τα ωοθυλάκια αρχικών αναπτυξιακών σταδίων (πρωτογενή και δευτερογενή) βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα. Η μείωση των ωοθυλακίων αυτών στις ενήλικες ωοθήκες, ισοδυναμεί με μείωση των διαθέσιμων ωοθυλακίων για μελλοντική ωορρηξία, στοιχείο που έχει συνδυαστεί με την εμφάνιση πρόωρης ωοθηκικής ανεπάρκειας.

Ένα ακόμη εύρημα της μελέτης μας, ήταν ο εντοπισμός κύστεων σε ωοθήκες θηλυκών μυών που είχαν εκτεθεί προγεννητικά στο μίγμα S0. Η παρουσία κύστεων μπορεί να συνδεθεί με την εμφάνιση του Συνδρόμου Πολυκυστικών Ωοθηκών στον άνθρωπο, μία πολύ συχνή ασθένεια του αναπαραγωγικού συστήματος τη σημερινή εποχή, ενώ έχει θεωρηθεί από διάφορους ερευνητές, ως ένδειξη αναπαραγωγικής γήρανσης.

Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, υποδεικνύουν ότι ενδοκρινικοί διαταράκτες, όπως οι φθαλικές ενώσεις, παρεμποδίζουν τη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος, θέτοντας τις βάσεις για την εκδήλωση διαφόρων παθολογιών. Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύουν την άποψη ότι οι χημικές αυτές ενώσεις αποτελούν κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου, αλλά και όλων των ζωντανών οργανισμών και ότι θα πρέπει να γίνουν προσπάθειες για περιορισμό της χρήσης τους και αντικατάστασής τους από άλλες, πιο ασφαλείς χημικές ουσίες.

7. ABSTRACT

Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) are chemical substances that can enter in the organism and disrupt the function of the endocrine system. One category of EDCs, phthalate esters or phthalates, are commonly used in the manufacturing of plastic and personal-care products and seem to be involved in the development of various types of disease. Studies suggest that one target of phthalate action is the reproductive system, which plays an important role in physiology mainly by producing gametes and synthesizing and secreting steroid hormones.

The deeper understanding of phthalate mechanism of action, is one of the goals of EDC-MixRisk Program, in which researchers from Europe and the USA are collaborating in order to ensure safer living conditions for future generations. The laboratory of Basic Biomedical Sciences of the Department of Dentistry (National and Kapodistrian University of Athens), as a partner of EDC-MixRisk Program, studies the impact of neonatal exposure to endocrine disruptors in mice.

Within the framework of this study, basic parameters that are influenced by the *in utero* exposure to phthalates' mixture, were assessed. These included: body weight in different developmental stages, anogenital distance (AGD) and vaginal opening used as an external index of puberty onset. In addition, in order to examine the impact of the mixture S0 on the basic organ of female reproductive system, the ovary, morphometric, histological and biochemical analysis were conducted in prepubertal and adult ovaries. Our objective was to determine the number and morphology of the ovarian follicles, along with the expression levels of the receptor FSHR, which mediates the signaling of a very important hormone of the female reproductive system, follicular stimulating hormone (FSH).

The results of our study, suggest that the *in utero* exposure of female mice to a mixture of phthalate esters, causes reduction of body weight during pre-puberty and changes of the anogenital distance, during neonatal life and pre-puberty. These results indicate that phthalate esters interfere with the normal function of metabolism and the development of secondary sex characteristics. On the other hand, they didn't seem to cause changes on the day of vaginal opening, a characteristic which is affected by other endocrine disruptors.

Concerning the ovary, even though its weight did not seem to change after the exposure to the phthalate mixture, many changes were caused in the ovarian histology. Specifically, morphometric study of ovarian sections, showed increased follicle atresia. The importance of the atresia was shown in the adult ovaries, where follicles of early developmental stages (primary and secondary) were significantly reduced. This reduction means a decrease in available follicles for future ovulations, a sign of premature ovarian failure.

During our study, we also observed ovarian cysts in females exposed to the mixture S0. Ovarian cysts have been linked with the occurrence of Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) in humans, a very common disease of female reproductive system nowadays. It has also been considered a sign of reproductive senescence.

In total, our results indicate that endocrine disrupting chemicals, such as phthalate esters, interfere with normal development and function of female reproductive system, setting the bases for the occurrence of various diseases. These findings enhance the notion that phthalates pose a severe danger for human health and for all living organisms and that many efforts should focus on the restriction of their use and their replacement from other, safer chemical substances.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abel MH, Wootton AN, Wilkins V, Huhtaniemi I, Knight PG, Charlton HM. The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology*. 2000;141:1795–1803.
- Adhikari, D. and Liu, K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine reviews* 30, 438–464 (2009).
- Adhikari D, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Hamalainen T, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Lan ZJ, Liu K. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Hum Mol Genet* 2010;3:397–410.
- Adibi JJ, Hauser R, Williams PL, et al. (2009). Maternal urinary metabolites of Di-(2-Ethylhexyl) phthalate in relation to the timing of labor in a US multicenter pregnancy cohort study. *Am J Epidemiol*, 169, 1015–24.
- Alm H, Kuhlmann S, Langhammer M, Tuchscherer A, Torner H, Reinsch N. Occurrence of polyovular follicles in mouse lines selected for high fecundity. *The Journal of reproduction and development*. 2010;56(4):449–453.
- Almeida M, Laurent MR, Dubois V, Claessens F, O'Brien CA, Bouillon R, Vanderschueren D, Manolagas SC. Estrogens and androgens in skeletal physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2017;97:135–187.
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK 2005 Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308:1466–1469.
- Anway MD, Skinner MK 2006 Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology* 147:S43–S49.
- Anway MD, Skinner MK 2008 Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the prostate transcriptome and adult onset disease. *Prostate* 68:517–529.
- Ashby J, Tinwell H, Lefevre PA, et al. Normal sexual development of rats exposed to butyl benzyl phthalate from conception to weaning. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1997;26:102–18.
- Ashley-Martin J., Dodds L., Arbuckle T.E., Ettinger A.S., Shapiro G.D., Fisher M., Morisset A.S., Taback S., Bouchard M.F., Monnier P., et al. A birth cohort study to investigate the association between prenatal phthalate and bisphenol A exposures and fetal markers of metabolic dysfunction. *Environ. Health*. 2014;13:84.
- Aso S, Ehara H, Miyata K, et al. A two-generation reproductive toxicity study of butyl benzyl phthalate in rats. *J Toxicol Sci*. 2005;30:39–58.
- Bachelot A., Binart N. Corpus luteum development: lessons from genetic models in mice. *Current Topics in Developmental Biology*. 2005;68:49–84.
- Bagnell CA, Mills TM, Costoff A, Mahesh VB. A model for the study of androgen effects on follicular atresia and ovulation. *Biol Reprod*. 1982;27:903–914.
- Baker TG. Radiosensitivity of mammalian oocytes with particular reference to the human female. *Am J Obstet Gynecol* (1971) 110(5):746–61.
- Baron D, Cocquet J, Xia X, Fellous M, Guiguen Y, Veitia RA. An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation. *J Mol Endocrinol*. 2004; 33:705–715.
- Beaumont HM, Mandl AM. 1962. A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 155:557– 79.
- Becker K, Seiwert M, Angerer J, Heger W, Koch HM, Nagorka R, et al. DEHP metabolites in urine of children and DEHP in house dust. *Int J Hyg Environ Health* (2004) 207(5):409–17.10.1078/1438-4639-00309.
- Bergman A, Heindel JJ, Kasten T, et al. The impact of endocrine disruption: a consensus statement on the state of the science. *Environ Health Perspect*. 2013;121(4):104–106.
- Bern HA. The fragile fetus. In: *Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Human/Wildlife Connection*. Princeton, NJ: Princeton Scientific Pub Co; 1992.
- Barrett ES, Swan SH. Stress and androgen activity during fetal development. *Endocrinology*. 2015;156:3435-3441.

- Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M. Genetic evidence equating SRY and the male sex determining gene. *Nature* 348: 448–450, 1990.
- Bhattacharya P, Keating AF. Impact of environmental exposures on ovarian function and role of xenobiotic metabolism during ovotoxicity. *Toxicol Appl Pharm.* 2012 261(3):227–35.10.1016/j.taap.2012.04.009
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJW. Oestrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology.* 1993;133:2204–2212.
- Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, et al. 1995. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 136:5–12.
- Bohm SK, Grady EF, Bunnett NW. 1997. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 322:1–18.
- Bonilla E, Del MJ. Deregulation of the Sod1 and Nd1 genes in mouse fetal oocytes exposed to mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) *Reprod Toxicol.* 2010;30:387–92.
- Bornehag CG, Carlstedt F, Jönsson BA, Lindh CH, Jensen TK, Bodin A, et al. 2014. Prenatal phthalate exposures and anogenital distance in Swedish boys. *Environ Health Perspect* 123:101–107.
- Borum K. Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Exp Cell Res* (1961) 24:495–507.doi:10.1016/0014-4827(61)90449-9.
- Braw RH, Tsafirri A. 1980. Effects of PMSG on follicular atresia in the rat ovary. *J. Reprod. Fertil.* 59:267–72.
- Braw RH, BarAmi S, Tsafirri A. 1981. Effect of hypophysectomy on atresia of rat preovulatory follicles. *Biol. Reprod.* 25:989–96.
- Britt KL, Drummond AE, Cox VA, Dyson M, Wreford NG, Jones MEE, Simpson ER, Findlay JK (2000) An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (aromatase) gene 1. *Endocrinology* 141, 2614–2623.
- Britt KL, Findlay JK. Estrogen actions in the ovary revisited. *J Endocrinol* (2002) 175(2):269–76.10.1677/joe.0.1750269.
- Brock O., Baum M. J. & Bakker J. The development of female sexual behavior requires prepubertal estradiol. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 5574–5578 (2011).
- Bullejos M, Bowles J, Koopman P. Extensive vascularization of developing mouse ovaries revealed by caveolin-1 expression. *Dev Dyn* 225: 95–99, 2002.
- Burger LL, Haisenleder DJ, Dalkin AC, Marshall JC. Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. *J Mol Endocrinol.* 2004;33:559–584.
- Burger LL, Haisenleder DJ, Aylor KW, Marshall JC. Regulation of intracellular signaling cascades by GNRH pulse frequency in the rat pituitary: roles for CaMK II, ERK, and JNK activation. *Biol Reprod.* 2008;79:947–953.
- Bustamante-Montes LP, Hernández-Valero MA, Flores-Pimentel D, García-Fábila M, Amaya-Chávez A, Barr DB, et al. 2013. Prenatal exposure to phthalates is associated with decreased anogenital distance and penile size in male newborns. *J Dev Orig Health Dis* 4:300–306.
- Calafat AM, Needham LL 2007 Human exposures and body burdens of endocrine-disrupting chemicals. In: Gore AC, ed. *Endocrine-disrupting chemicals: from basic research to clinical practice.* Totowa, NJ: Humana Press; 253–268.
- Calafat AM, Needham LL: What additional factors beyond state-of-the-art analytical methods are needed for optimal generation and interpretation of biomonitoring data? *Environ Health Perspect* 2009, 117:1481–1485.
- Caligioni C. S. (2009). Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* Appendix 4:Appendix 4I. 10.1002/0471142301.nsa04is48.
- Campos-Junior PHA, Marinho Assuncao C, Carvalho BC, Batista RI, Garcia RM, Viana JH. Follicular populations, recruitment and atresia in the ovaries of different strains of mice. *Reprod Biol.* 2012a. 12; 41–55.
- Carson RS, Findlay J, Burger H & Trounson A 1979 Gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biology of Reproduction* 21 75–87.

- Carson RS, Findlay JK, Clarke IJ, Burger HG. 1981. Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 24:105–13
- Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 2003;260:215–218.
- CDC 2005 Third National Report on human exposure to environmental chemicals Washington, DC: Centers for Disease Control and Prevention.
- Channing C & Kammerman S 1974 Binding of gonadotropins to ovarian cells. *Biology of Reproduction* 10 179–198.
- Chou YY, Huang PC, Lee CC, et al. (2009). Phthalate exposure in girls during early puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 22, 69–77.
- Christenson L & Strauss J III 2000 Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta* 1529 175–187.
- Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafiri A, et al. 1994. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous IGF-I. *Endocrinology* 135:1845–53
- Chun SY, Eisenhauer K, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJW. 1996. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 137: 1447–56
- Clarkson J., Boon W. C., Simpson E. R. & Herbison A. E. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology* 150, 3214–3220 (2009).
- Cobellis, L., et al., High plasma concentrations of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in women with endometriosis. *Hum Reprod*, 2003. 18(7): p. 1512-5.
- Colon I, Caro D, Bourdony CJ, Rosario O. (2000). Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ Health Perspect*, 108, 895–900.
- Conway BA, Mahesh VB, Mills TM. Effect of dihydrotestosterone on the growth and function of ovarian follicles in intact immature females primed with PMSG. *J Reprod Fert.* 1990;90:267–277.
- Coser KR, Chesnes J, Hur J, Ray S, Isselbacher KJ, Shioda T. 2003. Global analysis of ligand sensitivity of estrogen inducible and suppressible genes in MCF7/BUS breast cancer cells by DNA microarray. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13994–13999.
- Couse JF, Korach KS. Exploring the role of sex steroids through studies of receptor deficient mice. *J Mol Med* (1998) 76(7):497–511.10.1007/s001090050244.
- Craig ZR, Wang W, Flaws JA. Endocrine-disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. *Reproduction* (2011) 142(5):633–46.10.1530/REP-11-0136.
- Craig ZR, Hannon PR, Wang W, Ziv-Gal A, Flaws JA. Di-n-butyl phthalate disrupts the expression of genes involved in cell cycle and apoptotic pathways in mouse ovarian antral follicles. *Biol Reprod* (2013) 88(1):23.10.1095/biolreprod.112.105122
- Craig ZR, Singh J, Gupta RK, Flaws JA. Co-treatment of mouse antral follicles with 17beta-estradiol interferes with mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP)-induced atresia and altered apoptosis gene expression. *Reprod Toxicol* (2014) 45:45–51.10.1016/j.reprotox.2014.01.002
- Crews D, McLachlan JA 2006 Epigenetics, evolution, endocrine disruption, health, and disease. *Endocrinology* 147:S4–S10.
- Dalman A, Eimani H, Sepehri H, et al. Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on resumption of meiosis, in vitro maturation and embryo development of immature mouse oocytes. *Biofactors*. 2008;33:149–55.
- Davis VL, Couse JF, Goulding EH, Power SG, Eddy EM, Korach KS. Aberrant reproductive phenotypes evident in transgenic mice expressing the wild-type mouse estrogen receptor. *Endocrinology*(1994) 135(1):379–86.10.1210/endo.135.1.8013372
- DePaolo LV, Hirshfield AN, Anderson LD, Barraclough CA, Channing CP. Suppression of pituitary secretion of follicle-stimulating hormone by porcine follicular fluid during pro-oestrus and oestrus in the rat: effects on gonadotrophin and steroid secretion, follicular development and ovulation during the following cycle. *J Endocrinol.* 1979;83:355–368.

- Deroo BJ, et al. Estrogen receptor beta is required for optimal cAMP production in mouse granulosa cells. *Mol Endocrinol.* 2009;23(7):955–965.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 2009;30(4):293–342.
- Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia FM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P 1998 Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13612–134617.
- Drummond AE. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4:16. doi: 10.1186/1477-7827-4-16.
- ECHA 2010, Evaluation of new scientific evidence concerning the restrictions contained in Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH).
- ECHA 2013, Evaluation of new scientific evidence concerning DINP and DIDP in relation to entry 52 of Annex XVII to REACH Regulation (EC) No 1907/2006.
- Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev.* 2009; 30:624–712.
- Eisenhauer K, Chun SY, Billig H, Hsueh AJW. 1995. Growth hormone suppression of apoptosis in preovulatory follicles and partial neutralization by insulin-like growth factor binding protein (IGFBP). *Biol. Reprod.* 53:13–20
- Ema M, Miyawaki E, Kawashima K. Effects of dibutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. *Reprod Toxicol* 2000;14:13–9.
- Falck B. Site of production of oestrogen in the ovary of the rat. *Nature* (1959) 184 (Suppl14):1082.
- Fan HY, Liu Z, Cahill N, Richards JS. Targeted disruption of Pten in ovarian granulosa cells enhances ovulation and extends the life span of luteal cells. *Mol Endocrinol.* 2008;22(9):2128–2140.
- Farookhi R. Effects of androgen on induction of gonadotrophin receptors and gonadotrophin-stimulated adenosin 3', 5'-monophosphate production in rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology.* 1980;106:1216–1223.
- Fenwick MA , Mansour YT , Franks S , Hardy K . Identification and regulation of bone morphogenetic protein antagonists associated with preantral follicle development in the ovary. *Endocrinology* . 2011;152(9):3515–3526.
- Ferris HA, Shupnik MA. Mechanisms for pulsatile regulation of the gonadotropin subunit genes by GnRH1. *Biol Reprod.* 2006;74:993–998.
- Findlay JK, Britt K, Kerr JB, O'Donnell L, Jones ME, Drummond AE, et al. The road to ovulation: the role of oestrogens. *Reprod Fertil Dev* (2001) 13(7–8):543–7.10.1071/RD01071.
- Flaws JA, Hirshfield AN, Hewitt JA, Babus JK, Furth PA, 2001 Effect of Bcl-2 on the primordial follicle endowment in the mouse ovary. *Biology of Reproduction* 64 1153-1159.
- Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci* (2003) 78(3–4):135–63.10.1016/S0378-4320(03)00088-5.
- François CM, Petit F, Giton F, Gougeon A, Ravel C, Magre S, Cohen-Tannoudji J, Guigon CJ. A novel action of follicle-stimulating hormone in the ovary promotes estradiol production without inducing excessive follicular growth before puberty. *Scientific Reports.* 2017;7:46222.
- Frederiksen H, Sorensen K, Mouritsen A, et al. (2012). High urinary phthalate concentration associated with delayed pubarche in girls. *Int J Androl*, 35, 216–26.
- Freedman NJ, Lefkowitz RJ. 1996. Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res* 51:319–351; discussion 352–353.
- Fritz IB 1978 Sites of action of androgen and follicle stimulating hormone on cells of the seminiferous tubule. In: Litwck, G (ed) *Biochemical Actions of Hormones*. Academic Press, New York, vol 5:249–281.
- Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development.* 1990; 110:521–528.

- Giribabu N, Sainath S, Sreenivasula Reddy P. Prenatal di-n-butyl phthalate exposure alters reproductive functions at adulthood in male rats. *Environ Toxicol* 2013; (in press). Published online ahead of print 4 April 2012.
- Gondos B. Intercellular bridges and mammalian germ cell differentiation. *Differentiation* (1973) 1(2):177–82.
- Gore AC, et al. Executive summary to EDC-2: the endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr. Rev.* 2015;36:593–602.
- Gougeon A. 1993. Dynamics of human follicular growth: a morphological perspective. In *The Ovary*, ed. EY Adashi, PCK Leung, pp. 21–31. New York: Raven
- Green R, Hauser R, Calafat AM, et al. Use of di-(2-ethylhexyl)phthalate-containing medical products and urinary levels of mono-(2-ethylhexyl)phthalate in neonatal intensive care unit infants. *Environmental Health Perspectives*. 2005;113(9):1222–1225.
- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, et al. A gene mapping to the sex determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*. 1990; 346:245–250.
- Gubbay J, Koopman P, Collignon J, Burgoyne P, Lovell-Badge R. Normal structure and expression of Zfy genes in XY female mice mutant in Tdy. *Development* 109: 647–653, 1990.
- Gupta RK, Singh JM, Leslie TC, Meachum S, Flaws JA, Yao HH. Di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate inhibit growth and reduce estradiol levels of antral follicles in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* (2010) 242(2):224–30.10.1016/j.taap.2009.10.011
- Hage AJ, Groen-Klevant AC, Welschen R 1978 Follicle growth in the immature rat ovary. *Acta Endocrinol (Copenh)* 88:375–382.
- Hahn KL, Johnson J, Beres BJ, Howard S, Wilson-Rawls J. Lunatic fringe null female mice are infertile due to defects in meiotic maturation. *Development*. 2005;132(4):817–828.
- Hakuno N, Koji T, Yano T, Kobayashi N, Tsutsumi O, et al. 1996. Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology* 137:1938–48
- Hannon, P. R., Peretz, J., and Flaws, J. A. (2014). Daily exposure to Di(2-ethylhexyl) phthalate alters estrous cyclicity and accelerates primordial follicle recruitment potentially via dysregulation of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in adult mice. *Biol Reprod* 90, 136.
- Hannon, P. R., Brannick, K. E., Wang, W. & Flaws, J. A. Mono(2-ethylhexyl) phthalate accelerates early folliculogenesis and inhibits steroidogenesis in cultured mouse whole ovaries and antral follicles. *Biol. Reprod.* 92, 120 (2015).
- Hannon PR, Flaws JA. The effects of phthalates on the ovary. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015;6:8.
- Hanukoglu I 1992 Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 43 779–804.
- Hardy K. et al. . Onset and Heterogeneity of Responsiveness to FSH in Mouse Preantral Follicles in Culture. *Endocrinology* en20161435, doi: 10.1210/en.2016-1435 (2016).
- Hart R, Doherty DA, Frederiksen H, Keelan JA, Hickey M, Sloboda D, et al. The influence of antenatal exposure to phthalates on subsequent female reproductive development in adolescence: a pilot study. *Reproduction* (2014) 147(4):379–90.10.1530/REP-13-0331.
- Havelock JC, Rainey WE, Carr BR. Ovarian granulosa cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2004;228:67–78.
- Hayes TB, Anderson LL, Beasley VR, de Solla SR, Iguchi T, Ingraham H, Kestemont P, Kniewald J, Kniewald Z, Langlois VS, Luque EH, McCoy KA, Muñoz-de-Toro M, Oka T, Oliveira CA, Orton F, Ruby S, Suzawa M, Tavera-Mendoza LE, Trudeau VL, Victor-Costa AB, Willingham E. 2011. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127:64–73.
- Heeren AM, van Iperen L, Klootwijk DB, de Melo BA, Roost MS, Gomes Fernandes MM, et al. Development of the follicular basement membrane during human gametogenesis and early folliculogenesis. *BMC Dev Biol.* 2015;15:4. doi: 10.1186/s12861-015-0054-0.
- Henderson SA, Edwards RG 1968 Chiasma frequency and maternal age in mammals. *Nature* 218:22–28.

- Hernandez-Gonzalez I, et al. Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process? *Mol Endocrinol.* 2006;20(6):1300–1321.
- Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J. Phthalates: toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health* (2007) 210(5):623–34.10.1016/j.ijheh.2007.07.011.
- Hillier SG, Knazek RA, Ross GT. Androgenic stimulation of progesterone production by granulosa cells from preantral ovarian follicles: further in vitro studies using replicate cell cultures. *Endocrinology.* 1977;100:1539–1549.
- Hillier SG, Ross GT. Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in oestrogen-primed hypophysectomized immature female rats. *Biol Reprod.* 1979;20:261–268. doi: 10.1095/biolreprod20.2.261.
- Hillier SG, De Zwart FA. Evidence that granulosa cell aromatase induction/activation by follicle-stimulating hormone is an androgen receptor-regulated process in vitro. *Endocrinology.* 1981;109:1303–1305.
- Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the ‘two-cell, two-gonadotropin’ model revisited. *Mole Cell Endocrinol.* 1994;100:51–4.
- Hirshfield AN, Midgley ARJ. 1978. The role of FSH in the selection of large ovarian follicles in the rat. *Biol. Reprod.* 19:606–11
- Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* (1991) 124:43–101.
- Hirshfield AN 1994 Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. *Biol Reprod* 50:421–428.
- Hogberg J, Hanberg A, Berglund M, Skerfving S, Remberger M, Calafat AM, et al. Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environ Health Perspect* (2008) 116(3):334–9.10.1289/ehp.10788.
- Hoyer PJDaPB. Ovotoxic environmental chemicals: in direct endocrine disruptors. 2nd ed In: Naz R, editor. , editor. *Endocrine Disruptors: Effects on Male and Female Reproductive Systems.* Boca Raton, FL: CRC Press; (2005). p. 67–100.
- Hsueh AJW, Billig H, Tsafirri A. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr. Rev.* 15:1–18.
- Huang PC, Tsai EM, Li WF, et al. (2010). Association between phthalate exposure and glutathione S-transferase M1 polymorphism in adenomyosis, leiomyoma and endometriosis. *Hum Reprod*, 25, 986–94.
- Hunzicker-Dunn M, Maizels ET. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell Signal.* 2006;18(9):1351–1359.
- Iguchi T, Takasugi N, Bern HA, Mills KT. Frequent occurrence of polyovular follicles in ovaries of mice exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Teratology* 1986; 34: 29-35.
- Irving-Rodgers, H.F., van Wezel, I.L., Mussard, M.L., Kinder, J.E., Rodgers, R.J., 2001. Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles. *Reproduction* 122, 761–775.
- Irving-Rodgers HF, Rodgers RJ. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Semin Reprod Med.* 2006;24(4):195–203.
- Ismail A, Nawaz Z. 2005. Nuclear hormone receptor degradation and gene transcription: an update. *IUBMB Life* 57:483–490.
- Itoh H, Iwasaki M, Hanaoka T, et al. (2009). Urinary phthalate monoesters and endometriosis in infertile Japanese women. *Sci Total Environ*, 408, 37–42.
- Jager RJ, Anvret M, Hall K, Scherer G. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature* 348: 452–454, 1990.
- Jefferson WN, Couse JF, Padilla-Banks E, Korach KS, Newbold RR. Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER) alpha expression and multiocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERbeta-mediated and nonestrogenic actions. *Biol Reprod* 2002; 67: 1285-1296.
- Jensen TK, Frederiksen H, Kyhl HB, Lassen TH, Swan SH, Bornehag CG, Skakkebaek NE, Main KM, Lind DV, Husby S, Andersson AM. 2016. Prenatal exposure to phthalates and anogenital distance in male infants from a low-exposed Danish cohort (2010–2012). *Environ Health Perspect* 124:1107–1113

- Jia XC, Kessel B, Welsh TH, Jr, Hsueh AJW. Androgen inhibition of follicular-stimulating hormone stimulated luteinizing hormone receptor formation in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 1985;117:13–22.
- Johnson AL. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod Sci*. 2003;78(3–4):185–201. doi: 10.1016/S0378-4320(03)00090-3.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL 2004 Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428:145–150
- Johansson HKL, Svingen T, Fowler PA, Vinggaard AM, Boberg J. Environmental influences on ovarian dysgenesis developmental windows sensitive to chemical exposures. *Nat Rev Endocrinol*. 2017 Jul;13(7):400–414. doi: 10.1038/nrendo.2017.36. Epub 2017 Apr 28.
- Jones RE. *Human Reproductive Biology*. Academic Press; San Diego, CA: 1997. p. 581.
- Kabir E. R., Rahman M. S., Rahman I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40 241–258. 10.1016/j.etap.2015.06.009.
- Kagabu S, Umezu M: Histological analysis of the 'critical point' in follicular development in mice. *Reproductive Medicine and Biology* 2004, 3(3):141–145
- Kaipia A, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AWJ. 1996. Tumor necrosis factor- α and its second messenger, ceramide, stimulate apoptosis in cultured ovarian follicles. *Endocrinology* 137:4864–70
- Kaipia A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. *Ann Rev Physiol*. 1997;59: 349–363.
- Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, Cunningham M, Faustman E, Foster P, et al. NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of butyl benzyl phthalate. *Reprod Toxicol*. 2002a;16:453–487
- Kay V.R., Chambers C., Foster W.G. Reproductive and developmental effects of phthalate diesters in females. *Crit. Rev. Toxicol*. 2013;43:200–219.
- Khetan K. Sushil. *Endocrine Disruptors in the Environment*. 2014. Published by John Wiley and Sons Inc. Hoboken, New Jersey.
- Kidd, K.A., Becher, G., Bergman, A., Muir, D.C.G., Woodruff, T.J., 2012. Human and wildlife exposures to EDC's. Chapter 3. State of the science of endocrine disrupting chemicals. UNEP, 189–250.
- Kim H, Nakajima T, Hayashi S, et al. Effects of diethylstilbestrol on programmed oocyte death and induction of polyovular follicles in neonatal mouse ovaries. *Biol Reprod*. 2009;81:1002–1009
- Kim SH, Chun S, Jang JY, et al. (2011). Increased plasma levels of phthalate esters in women with advanced-stage endometriosis: a prospective case-control study. *Fertil Steril*, 95, 357–9.
- Kloner RA, Carson C, 3rd, Dobs A, Kopecky S, Mohler ER., 3rd Testosterone and cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67:545–557.
- Knight PG, Glistler C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 2006;132:191–206.
- Koch HM, Bolt HM, Angerer J. Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Archives of Toxicology*. 2004a;78(3):123–130.
- Koch HM, Drexler H, Angerer J. Internal exposure of nursery-school children and their parents and teachers to di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2004b;207(1):15–22.
- Koch HM, Calafat AM. Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (2009) 364(1526):2063–78.10.1098/rstb.2008.0208.
- Koch HM, Kolossa-Gehring M, Schröter-Kermani C, Angerer J, Brüning T: Bisphenol A in 24 h urine and plasma samples of the German Environmental Specimen Bank from 1995 to 2009: a retrospective exposure evaluation. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2012, 22:610–616.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*. 1991; 351:117–121.
- Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*. 1993;132(6):2279–2286.
- Krotz SP, Carson SA, Tomey C, Buster JE. Phthalates and bisphenol do not accumulate in human follicular fluid. *J Assist Reprod Genet* 2012 29(8):773–7.10.1007/s10815-012-9775-1.

- Kuiri-Hänninen T. et al. . Postnatal ovarian activation has effects in estrogen target tissues in infant girls. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 4709–4716 (2013).
- Kumar P, Sait SF. Luteinizing hormone and its dilemma in ovulation induction. *J Hum Reprod Sci* (2011) 4(1):2–7.10.4103/0974-1208.82351.
- Larsson K, Lindh CH, Jönsson BA, Giovanoulis G, Bibi M, Bottai M, Bergström A, Berglund M. Phthalates, non-phthalate plasticizers and bisphenols in Swedish preschool dust in relation to children's exposure. *Environ Int.* 2017 May;102:114-124.
- Latini G, De FC, Presta G, et al. (2003). In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environ Health Perspect*, 111, 1783–5.
- Latini G., Scoditti E., Verrotti A., De Felice C., Massaro M. Peroxisome proliferator-activated receptors as mediators of phthalate-induced effects in the male and female reproductive tract: Epidemiological and experimental evidence. *PPAR.* 2008;2008:359267.
- Lee H, Yamanouchi K, Nishihara M. Effects of perinatal exposure to phthalate/adipate esters on hypothalamic gene expression and sexual behavior in rats. *J Reprod Dev* 2006;52:343–52.
- Lehman K, Phillips S, Sar M, Foster P, Gaido K. Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci* 2004; 81:60–68.
- Li L, Liu JC, Lai FN, Liu HQ, Zhang XF, Dyce PW et al. 2016 Di (2-ethylhexyl) phthalate exposure impairs growth of antral follicle in mice. *PLoS ONE* 2016; 11: e0148350.
- Lintern-Moore S, Moore GP. The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary. *Biol Reprod.* 1979; 20:773–778.
- Liu CF, Liu C, Yao HH. Building pathways for ovary organogenesis in the mouse embryo. *Curr Top Dev Biol.* 2010a; 90:263–290.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) method. *Method.* 2001;25:402–408.
- Lohse MJ. 1993. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta* 1179:171–188.
- Longnecker MP, Rogan WJ, Lucier G 1997 The human health effects of DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and PCBS (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health. *Annu Rev Public Health* 18:211–244.
- Louvet JP, Harman SM, Schrieber JR, RossGT. 1975. Evidence of a role of adrogens in follicular maturation. *Endocrinology* 97:366–72
- Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner M (2013) Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Adult-Onset Disease and Sperm Epimutations. *PLoS ONE* 8: e55387.
- Marco Conti, R. Jeffrey Chang, in *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)*, 2016. Volume II.
- Marsee K, Woodruff TJ, Axelrad DA, Calafat AM, Swan SH. Estimated daily phthalate exposures in a population of mothers of male infants exhibiting reduced anogenital distance. *Environ Health Perspect*(2006) 114(6):805–9.10.1289/ehp.8663.
- Masutomi N, Shibutani M, Takagi H, Uneyama C, Takahashi N, Hirose M. Impact of dietary exposure to methoxychlor, genistein, or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine / reproductive systems in later life. *Toxicology.* 2003;192:149–170.
- McLean AC, Valenzuela N, Fai S, et al. . Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification . *J Vis Exp* 2012. ;(67): e4389.
- McMullen ML, Cho BN, Yates CJ, Mayo KE. Gonadal pathologies in transgenic mice expressing the rat inhibin alpha-subunit. *Endocrinology.* 2001;142(11):5005–5014.
- Miller W 1988 Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine Reviews* 9 295–318.
- Monk M, McLaren A. X-chromosome activity in foetal germ cells of the mouse. *J Embryol Exp Morphol.* 1981; 63:75–84.
- Montano MM, Welshons WV, vom Saal FS. Free estradiol in serum and brain uptake of estradiol during fetal and neonatal sexual differentiation in female rats. *Biol Reprod* (1995) 53(5):1198–207.10.1095/biolreprod53.5.1198.

- Moral R, et al. In utero exposure to butyl benzyl phthalate induces modifications in the morphology and the gene expression profile of the mammary gland: an experimental study in rats. *Environmental health: a global access science source*. 2011;10:5.
- Morita Y, Tilly JL 1999 Oocyte apoptosis: like sand through hourglass. *Developmental Biology* 213 1-17
- Morita, Y., Tilly, J.L., 2000. Sphingolipid regulation of female gonadal cell apoptosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 905, 209–220.
- Morita, Y., Maravei, D.V., Bergeron, L., Wang, S., Perez, G.I., Tsutsumi, O., Taketani, Y., Asano, M., Horai, R., Korsmeyer, S.J., Iwakura, Y., Yuan, J., Tilly, J.L., 2001. Caspase 2 deficiency prevents programmed germ cell death resulting from cytokine insufficiency but not meiotic defects caused by loss of ataxia telangiectasia-mutated (Atm) gene function. *Cell Death Differ.* 8, 614–620.
- Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, Hataya Y, Shimatsu A, Kuzuya H, Nakao K. 2002. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5185–5190.
- Moyer B, Hixon ML. Reproductive effects in F1 adult females exposed in utero to moderate to high doses of mono-2-ethylhexylphthalate (MEHP) *Reprod Toxicol.* 2012;34:43–50.
- Mu, X. et al. DEHP exposure impairs mouse oocyte cyst breakdown and primordial follicle assembly through estrogen receptor-dependent and independent mechanisms. *J. Hazard. Mater.* 298, 232–240 (2015).
- Mullis KB et al. "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* vol. 51 pp. 263–73 (1986)
- Murray AA, Gosden RG, Allison V, Spears N. Effect of androgens on the development of mouse follicles growing in vitro. *J Reprod Fert.* 1998;113:27–33.
- Nagao T, Ohta R, Marumo H, et al. Effect of butyl benzyl phthalate in Sprague–Dawley rats after gavage administration: a two-generation reproductive study. *Reprod Toxicol.* 2000;14:513–32.
- Nandedkar TD, Munshi SR. Effect of dihydrotestosterone on follicular development, ovulation and reproductive capacity of mice. *J Reprod Fert.* 1981;62:21–24.
- National Institute of Environmental Health Sciences. 2010.
- Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod.* 1982;27:327–339.
- Niermann S, Rattan S, Brehm E, Flaws JA. Prenatal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) affects reproductive outcomes in female mice. *Reprod Toxicol.* 2015;53:23–32.
- Ohara A, Mori T, Taii S, Ban C, Narimoto K. Functional differentiation in steroidogenesis of two types of luteal cells isolated from mature human corpora lutea of menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* (1987) 65(6):1192–200.
- Ohno S, Smith JB. 1964. Role of fetal follicular cells in meiosis of mammalian oocyte. *Cytogenetics* 3:324–33
- Ojeda SR, Urbancki HF. Puberty in the rat. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Physiology of Reproduction*. Raven Press; New York: 1994. pp. 363–409.
- Oktay K , Briggs D , Gosden RG . Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab* . 1997;82(11):3748–3751.
- Oktem O, Oktay K. The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1127:1–9.
- Oktem O, Urman B. Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod* (2010) 25(12):2944–54.10.1093/humrep/deq275.
- Ottolenghi C, Pelosi E, Tran J, Colombino M, Douglass E, et al. Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum Mol Genet.* 2007; 16:2795–2804.
- Palmer MS, Sinclair AH, Berta P, Ellis NA, Goodfellow PN, Abbas NE, Fellous M. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 342: 937–939, 1989.
- Papavasiliou SS, Zmeili S, Khoury S, Landefeld TD, Chin WW, Marshall JC. Gonadotropin-releasing hormone differentially regulates expression of the genes for luteinizing hormone alpha and beta subunits in male rats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:4026–4029.

- Park Y, et al. Induction of cyclin D2 in rat granulosa cells requires FSH-dependent relief from FOXO1 repression coupled with positive signals from Smad. *J Biol Chem.* 2005;280(10):9135–9148.
- Parkening TA, Collins TJ, Smith ER. Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle. *Neurobiol Aging.* 1982;3:31–5.
- Pate, J., Johnson-Larson, C. and Ottobre, J. (2012), Life or Death Decisions in the Corpus Luteum. *Reproduction in Domestic Animals*, 47: 297–303.
- Payne RW, Hellbaum AA. The effects of oestrogens on the ovary of the hypophysectomised rat. *Endocrinology.* 1955;57:193–199.
- Peijnenburg WJ, Struijs J. Occurrence of phthalate esters in the environment of The Netherlands. *Ecotoxicol Environ Saf* (2006) 63(2):204–15.10.1016/j.ecoenv.2005.07.023
- Peltoketo H, Strauss L, Karjalainen R, Zhang M, Stamp GW, Segaloff DL, et al. 2010. Female mice expressing constitutively active mutants of FSH receptor present with a phenotype of premature follicle depletion and estrogen excess. *Endocrinology* 151 1872 1883, doi:10.1210/en.2009-0966
- Penning T 1997 Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocrine Reviews* 18 281–305.
- Pepling ME, Spradling AC. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development* 125: 3323–3328, 1998.
- Perng W, Watkins DJ, Cantoral A, Mercado-García A, Meeker JD, Téllez-Rojo MM, Peterson KE. Exposure to phthalates is associated with lipid profile in peripubertal Mexican youth. *Environ Res.* 2017 Apr; 154:311-317.
- Pisarska MD, Barlow G, Kuo FT. Minireview: roles of the forkhead transcription factor FOXL2 in granulosa cell biology and pathology. *Endocrinology.* 2011; 152:1199–1208.
- Pocar P, Fiandanese N, Secchi C, et al. Exposure to di(2-ethyl-hexyl) phthalate (DEHP) in utero and during lactation causes long-term pituitary-gonadal axis disruption in male and female mouse offspring. *Endocrinology.* 2012;153:937–48.
- Pocar P, Fiandanese N, Berrini A, Secchi C, Borromeo V. Maternal exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) promotes the transgenerational inheritance of adult-onset reproductive dysfunctions through the female germline in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017 May 1;322:113-121. doi: 10.1016/j.taap.2017.03.008. Epub 2017 Mar 9.
- Pollack SE, Furth EE, Kallen CB, Arakane F, Kiriakidou M, et al. Localization of the steroidogenic acute regulatory protein in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:4243–4251.
- Porte C, Janer G, Lorusso LC, Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP, Fossi MC, Canesi L 2006 Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 143:303–315.
- Pratap Kumar and Sameer Farouk Sait. Luteinizing hormone and its dilemma in ovulation induction. *J Hum Reprod Sci.* 2011 Jan-Apr; 4(1): 2–7.
- Rajareddy S, Reddy P, Du C, Liu L, Jagarlamudi K, Tang W, Shen Y, Berthet C, Peng SL, Kaldis P. et al. p27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing follicle endowment and activation and promoting follicle atresia in mice. *Mol Endocrinol* 2007;9:2189–2202.
- Rasier G, Parent AS, Gérard A, Lebrethon MC, Bourguignon JP 2007 Early maturation of gonadotropin-releasing hormone secretion and sexual precocity after exposure of infantile female rats to estradiol or dichlorodiphenyltrichloroethane. *Biol Reprod* 77:734–74.
- Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL. 1995. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the number of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology* 136:3665–68
- Raymond J. Rodgers Helen F. Irving-Rodgers, Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid, *Biology of Reproduction*, Volume 82, Issue 6, 1 June 2010, Pages 1021–1029.
- Reddy BS, Rozati R, Reddy S, et al. (2006). High plasma concentrations of polychlorinated biphenyls and phthalate esters in women with endometriosis: a prospective case control study. *Fertil Steril*, 85, 775–9.
- Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hamalainen T, Peng SL. et al. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 2008;5863:611–613.

- Redmer, D. A., and Reynolds, L. P. (1996). Angiogenesis in the ovary. *Rev. Reprod.* 1, 182–192.
- Rey R. A. Mini-puberty and true puberty: differences in testicular function. *Ann. Endocrinol.* 75, 58–63 (2014).
- Rice S , Ojha K , Whitehead S , Mason H . Stage-specific expression of androgen receptor, follicle-stimulating hormone receptor, and anti-Müllerian hormone type II receptor in single, isolated, human preantral follicles: relevance to polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* . 2007;92(3):1034–1040.
- Richards JS, Midgley AR 1976 Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Biol Reprod* 14:82–94.
- Richards JS, Jonassen JA, Rolfes AI, Kersey K, Reichert LE., Jr Adenosine 3', 5'-monophosphate, LH receptor and progesterone during granulosa cell differentiation: effects of oestradiol and FSH. *Endocrinology.* 1979;104:765–773.
- Richards JS, Rolfes AI. Hormonal regulation of cyclic AMP binding to specific receptor proteins in rat ovarian follicles. *J Biol Chem.* 1980;225:5481–5489.
- Richards JS 1980 Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev* 60:51–59.
- Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest.* 2010;120:963–972. doi: 10.1172/JCI41350.
- Rivier C, Rivier J, Vale W 1986 Inhibin-mediated feedback control of folliclestimulating hormone secretion in the female rat. *Science* 234:205–208.
- Robker, R. L., and Richards, J. S. (1998b). Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: A coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. *Mol. Endocrinol.* 12, 924–940.
- Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF, Russell DL. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction.* 2003;126(4):415–24.
- Rodriguez I, Araki K, Khatib K, Martinou JC, Vassalli P. Mouse vaginal opening in an apoptosis-dependent process which can be prevented by the overexpression of Bcl2. *Dev Biol.* 1997;197;184:115–121.
- Saillenfait AM, Sabate JP, Gallissot F. Comparative embryotoxicities of butyl benzyl phthalate, mono-n-butyl phthalate and mono-benzyl phthalate in mice and rats: in vivo and in vitro observations. *Reprod Toxicol.* 2003;17:575–83.
- Salazar V, Castillo C, Ariznavarreta C, Campon R, Tresquerres J. Effect of oral intake of dibutyl phthalate on reproductive parameters of Long Evans rats and pre-pubertal development of their offspring. *Toxicology* 2004;205:131–7.
- Sanders SL, Stouffer RL. Localization of steroidogenic enzymes in macaque luteal tissue during the menstrual cycle and simulated early pregnancy: immunohistochemical evidence supporting the two-cell model for estrogen production in the primate corpus luteum. *BiolReprod* (1997) 56(5):1077–87.
- Santangeli S, Maradonna F, Zanardini M, Notarstefano V, Gioacchini G, Forner-Piquer I, Habibi H, Carnevali O. Effects of diisononyl phthalate on *Danio rerio* reproduction. *Environ Pollut.* 2017 Dec;231(Pt 1):1051-1062. doi: 10.1016/j.envpol.2017.08.060. Epub 2017 Sep 25.
- Schmid, P., Schlatter, C., 1985. Excretion and metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate in man. *Xenobiotica* 15, 251–256.
- Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, et al. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development.* 2004; 131:933–942.
- Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;127(3–5):204–215.
- Schug T.T., Johnson A.F., Birnbaum L.S., Colborn T., Guillette L.J., Jr., Crews D.P., Collins T., Soto A.M., Vom Saal F.S., McLachlan J.A., et al. Minireview: Endocrine disruptors: Past lessons and future directions. *Mol. Endocrinol.* 2016;30:833–847. doi: 10.1210/me.2016-1096.
- Schwartz NB. 1974. The role of FSH and LH and of their antibodies on follicular growth and on ovulation. *Biol. Reprod.* 10:236–76

- Seeburg PH, Mason AJ, Stewart TA, Nikolics K. The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction. *Recent Prog Horm Res.* 1987;43:69–98.
- Sen A, Hammes SR. Granulosa cell-specific androgen receptors are critical regulators of ovarian development and function. *MolEndocrinol.* 2010;24:1393–1403.
- Sen N., X. Liu, Z.R. Craig Short term exposure to di-n-butyl phthalate (DBP) disrupts ovarian function in young CD-1 mice *Reprod Toxicol*, 53 (2015), pp. 15-22.
- Serdar E. Bulun, *Physiology and Pathology of the Female Reproductive Axis in Williams Textbook of Endocrinology (Thirteenth Edition)*, 2016.
- Sheehan DM. (2006) No-threshold dose-response curves for nongenotoxic chemicals: findings and applications for risk assessment. *Environ Res* 100, 93–99.
- Shimada M, Gonzalez-Robayna I, Hernandez- Gonzalez I, Richards JS. Paracrine and autocrine regulation of EGF-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key role for prostaglandin synthase 2 (Ptgs2) and progesterone receptor (Pgr). *Mol Endocrinol.* 2006;20(2):348–364.
- Silva MJ, Slakman AR, Reidy JA, et al. Analysis of human urine for fifteen phthalate metabolites using automated solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B.* 2004a;805(1):161–167.
- Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, et al. Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. *Environmental Health Perspectives.* 2004b;112(3):331–338.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, et al. A gene from the human sexdetermining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 1990; 346:240–244.
- Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update* (2005) 11(5):461–71.10.1093/humupd/dmi020.
- Sohoni P, Sumpter JP. 1998. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol*158:327–339 .
- Sowers MR, La Pietra MT. Menopause: its epidemiology and potential association with chronic diseases. *Epidemiol Rev* (1995) 17(2):287–302.
- Stewart J. & Cygan D. Ovarian hormones act early in development to feminize adult open-field behavior in the rat. *Horm. Behav.* 14, 20–32 (1980).
- Strauss J III, Kallen C, Christenson L, Watari H, Devoto L, Arakane F & Kiriakidou M 1999 The steroidogenic acute regulatory protein (StAR): a window into the complexities of intracellular cholesterol trafficking. *Recent Progress in Hormone Research* 54 394.
- Suzuki Y, Yoshinaga J, Mizumoto Y, Serizawa S, Shiraishi H. 2012. Foetal exposure to phthalate esters and anogenital distance in male newborns. *Int J Androl* 35:236–244.
- Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, et al. 2005. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* 113:1056–1061.
- Swan SH. 2008. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ Res* 108:177–184.
- Tabacova S, Little R, Balabaeva L. (1999). Maternal exposure to phthalates and complications of pregnancy. *Epidemiology*, 10, S127.
- Takagi K, Yamada, Miki Y, Umegaki T, Nishimura M, Sasaki J 2007 Histological observation of the development of follicle and follicular atresia in immature rat ovaries. *Acta Medical Okayama* 61 (Suppl 5) 283-298.
- Tartaglia LA, Rothe M, Hu YF, Goeddel DV. 1993. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73:213–16
- Terranova PF. 1981. Steroidogenesis in experimentally induced atretic follicles of the hamster: a shift from estradiol to progesterone synthesis. *Endocrinology* 108:1885–90
- Thackray VG, McGillivray SM, Mellon PL. Androgens, progestins and glucocorticoids induce follicle-stimulating hormone β -subunit gene expression at the level of the gonadotrope. *Mol Endocrinol.* 2006;20:2062–2079.

- Thackray VG, Mellon PL, Coss D. Hormones in synergy: regulation of the pituitary Gonadotropin genes. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;314:192–203.
- Thompson C, Ross S, Gaido K. Di(n-butyl) phthalate impairs cholesterol transport and steroidogenesis in the fetal rat testis through a rapid and reversible mechanism. *Endocrinology* 2004; 145:1227–1237.
- Tilghman SL, Nierth-Simpson EN, Wallace R, Burow ME, McLachlan JA. 2010. Environmental hormones: Multiple pathways for response may lead to multiple disease outcomes. *Steroids* 75:520–523.
- Tilly, J.L., 2001. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 838–848.
- Toft G, Jonsson BA, Lindh CH, et al. (2012). Association between pregnancy loss and urinary phthalate levels around the time of conception. *Environ Health Perspect*, 120, 458–63.
- Tran V, Tindula G, Huen K, Bradman A, Harley K, Kogut K, Calafat AM, Nguyen B, Parra K, Ye X, Eskenazi B, Holland N. Prenatal phthalate exposure and 8-isoprostane among Mexican-American children with high prevalence of obesity. *J Dev Orig Health Dis.* 2017 Apr;8(2):196-205.
- Tsai Y.A., Lin C.L., Hou J.W., Huang P.C., Lee M.C., Chen B.H., Wu M.T., Chen C.C., Wang S.L., Lee C.C., Hsiung C.A., Chen M.L., RAPIT Group. Effects of high di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) exposure due to tainted food intake on pre-pubertal growth characteristics in a Taiwanese population. *Environ. Res.* 2016; 49, 197–205.
- Tsuchiya Y, Nakajima M & Yokoi T 2005 Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Letters* 227 115–124.
- Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Fail PA, Seely JC, Brine DR, et al. Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (bbp) in rats. *Reprod Toxicol.* 2004;18:241–264.
- Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, et al. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell.* 2009; 139:1130–1142.
- UNEP and WHO, 2013. United Nations Environment Programme and the World Health Organization, 2013. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals-2012.
- Ungewitter EK, Yao HH. How to make a gonad: cellular mechanisms governing formation of the testes and ovaries. *Sex Dev.* 2013;7(1–3):7–20. Epub 2012/05/23. PubMed Central PMCID: PMC3474884
- Vagi SJ, Azziz-Baumgartner E, Sjodin A, Calafat AM, Dumesic D, Gonzalez L, et al. Exploring the potential association between brominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, perfluorinated compounds, phthalates, and bisphenol a in polycystic ovary syndrome: a case-control study. *BMC Endocr Disord* (2014) 14(1):86.10.1186/1472-6823-14.
- Vale W, Rivier C, Brown M. Regulatory peptides of the hypothalamus. *Ann Rev Physiol.* 1977;39:473–527.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee DH et al. (2012) Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 33, 378–455.
- Vandenberg LN, et al. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Rev.* 2012;33:378–455.
- Vendola KA, Zhou J, Wang J, Bondy CA. Androgens promote insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-I receptor gene expression in the primate ovary. *Human Reprod.* 1999;14:2328–2332. doi: 10.1093/humrep/14.9.2328.
- Ventrice P, Ventrice D, Russo E, De Sarro G. Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013;36:88–96.
- Vogel SA. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a “safety.” *Am J Public Health.* 2009;99(suppl 3):S559–S566.
- vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, et al. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(5):2056–2061.

- Walmer DK, Wrona MA, Hughes CL, Nelson KG. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinol.* 1992;131:1458–1466.
- Wang H, Andoh K, Hagiwara H, Xiaowei L, Kikuchi N, Abe Y, Yamada K, Fatima R, Mizunuma H. Effect of adrenal and ovarian androgens on type 4 follicles unresponsive to FSH in immature mice. *Endocrinology.* 2001;142:4930–4936.
- Wang W, Craig ZR, Basavarajappa MS, et al. Di (2-ethylhexyl) phthalate inhibits growth of mouse ovarian antral follicles through an oxidative stress pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012a;258:288–95.
- Wang W, Craig ZR, Basavarajappa MS, et al. Mono (2-ethylhexyl) phthalate induces oxidative stress and inhibits growth of mouse ovarian antral follicles. *Biol Reprod.* 2012b;87:152.
- Wellons M. Cardiovascular disease and primary ovarian insufficiency. *Semin Reprod Med.* 2011;29:328–341.
- Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, vom Saal FS. 2003. Large effects from small exposures: I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect* 111:994–1006 .
- Weuve J, Hauser R, Calafat AM, et al. (2010). Association of exposure to phthalates with endometriosis and uterine leiomyomata: findings from NHANES, 1999–2004. *Environ Health Perspect*, 118, 825–32.
- Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev.* 2007;87:1–28.
- Williams PC. Effect of stilboestrol on the ovaries of hypophysectomized rat. *Nature.* 1940;145:388–389.
- Wittassek M, Koch HM, Angerer J, Bruning T. Assessing exposure to phthalates – the human biomonitoring approach. *Mol Nutr Food Res* (2011) 55(1):7–31.10.1002/mnfr.201000121.
- Wolff MS, Engel SM, Berkowitz GS, et al. (2008). Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. *Environ Health Perspect*, 116, 1092–7.
- Wolff MS, Swan S: Phthalate biomarkers in pediatric research, eletter. *Pediatrics* 2010.
- Wolff MS, Teitelbaum SL, Pinney SM, et al. (2010). Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls. *Environ Health Perspect*, 118, 1039–46.
- Wood JR, Strauss JF 3rd. Multiple signal transduction pathways regulate ovarian steroidogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* 2002;3:33–46.
- Woodruff TK, Mayo KE 1990 Regulation of inhibin synthesis in the rat ovary. *Annu Rev Physiol* 52:807
- Woodruff TK, Krummen LA, Lyon RJ, Stocks DL, Mather JP. Recombinant human inhibin A and recombinant human activin A regulate pituitary and ovarian function in the adult female rat. *Endocrinology.* 1993;132:2332–2341.
- Wyllie AH. 1987. Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J. Pathol.* 153:313– 16.
- Yao, H.H., Volentine, K.K., Bahr, J.M., 1998. Destruction of the germinal disc region of an immature preovulatory chicken follicle induces atresia and apoptosis. *Biol. Reprod.* 59, 516–521.
- Zeleznik AJ, Hillier SG, Ross GT. 1979. Follicle stimulating hormone-induced follicular development: an examination of the role of androgens. *Biol. Reprod.* 21:673–81
- Zelieann R. Craig, Patrick R. Hannon, Wei Wang, Ayelet Ziv-Gal, Jodi A. Flaws; Di-n-Butyl Phthalate Disrupts the Expression of Genes Involved in Cell Cycle and Apoptotic Pathways in Mouse Ovarian Antral Follicles, *Biology of Reproduction*, Volume 88, Issue 1, 1 January 2013, 23, 1–10.
- Zhang, X.-F. et al. Diethylhexyl phthalate exposure impairs follicular development and affects oocyte maturation in the mouse. *Environ. Mol. Mutagen.* 54, 354–361 (2013).
- Zhang, T. et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate and bisphenol A exposure impairs mouse primordial follicle assembly in vitro. *Environ. Mol. Mutagen.* 55, 343–353 (2014).
- Zhang, X.-F. et al. Transgenerational inheritance of ovarian development deficiency induced by maternal diethylhexyl phthalate exposure. *Reprod. Fertil. Dev.* 27, 1213–1221 (2015).
- Zhou C, Flaws JA. Effects of an environmentally relevant phthalate mixture on cultured mouse antral follicles. *Toxicol Sci.* 2017; 156(1):217–229.

- Zhou C, Gao L, Flaws JA. Prenatal exposure to an environmentally relevant phthalate mixture disrupts reproduction in F1 female mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017;318:49–57.
- Zhou C, Gao L, Flaws JA. Exposure to an Environmentally Relevant Phthalate Mixture Causes Transgenerational Effects on Female Reproduction in Mice. *Endocrinology*. 2017 Jun 1;158(6):1739-1754.
- Zoeller RT, et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology*. 2012;153:4097–4110.
- Zou K , Yuan Z , Yang Z , Luo H , Sun K , Zhou L , Xiang J , Shi L , Yu Q , Zhang Y , Hou R , Wu J 2009 Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 11:631–636.