

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2017

Aneta Franková

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra veterinárních disciplín



**Vliv bisfenolu S na expresi a lokalizaci estrogenových
receptorů alfa během meiotického zrání prasečích oocytů**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Aneta Franková

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: Ing. Tereza Žalmanová, Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv bisfenolu S na expresi a lokalizaci estrogenových receptorů alfa během meiotického zrání prasečích oocytů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne

.....

podpis autora práce

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Tereze Žalmanové, Ph.D., Ing. Kristýně Hoškové, Ph.D. a Ing. Šárce Prokešové za odborné vedení mé diplomové práce a čas věnovaný radám a připomínkám, které přispěly ke zpracování této práce, dále také za vedení při laboratorní práci, trpělivost a vstřícný přístup. Díky patří také mé rodině a mému nastávajícímu za podporu a trpělivost.

Vliv bisfenolu S na expresi a lokalizaci estrogenových receptorů alfa během meiotického zrání prasečích oocytů

Souhrn

Meióza je důležitý komplex procesů při tvorbě oplození schopného oocytu. Aby byla úspěšná, musí všechny faktory, které se jí účastní a podílejí se na její regulaci, správně fungovat. Jedním z faktorů důležitých pro správný vývoj jsou estrogenové receptory (ERs), které fungují jako ligandem aktivované transkripční faktory a regulují transkripci genů ovlivňovaných estrogény. Přestože je zrající oocyt transkripčně inaktivní, ERs jsou nepostradatelné v dalším vývoji při nástupu transkripce u embrya. Jakékoliv narušení může vést k závažným chybám a vyřazení oocytu ze zásoby zárodečných buněk. Toto narušení mohou způsobit některé látky vyskytující se běžně v každodenním životě, které působí na organismus rozvrácením jeho tělesné homeostázy. Takovými látkami jsou endokrinní disruptory, mezi něž patří chemické komponenty při výrobě plastů – bisfenoly. Dříve se hojně používal bisfenol A (BPA), nicméně pro jeho škodlivé účinky na organismus je postupně vyřazován z výroby a nahrazován strukturálními analogy, jako je například bisfenol S (BPS). Cílem práce bylo ověřit hypotézu, zda BPS negativně ovlivňuje průběh meiotického zrání prasečích oocytů prostřednictvím změn v expresi a intracelulární lokalizaci ER α . Hypotéza byla ověřována pomocí imunocytochemické detekce proteinů – ER α v prasečích oocytech kultivovaných 24 a 48 hodin v přítomnosti různých koncentrací BPS. Pomocí snímků z fluorescenčního mikroskopu byla sledována lokalizace a relativní intenzita fluorescence ER α . Experimenty ukázaly, že BPS ovlivňuje lokalizaci ER α v prasečích oocytech a to vytvářením silně homogenních struktur nebo vytvářením shluků. Dalším vlivem BPS na ER α byla jejich zvýšená exprese. Při kultivaci 24 hodin byla nejvyšší intenzita fluorescence naměřena u oocytů kultivovaných v 30 μ M BPS, kdežto při delší kultivaci 48 hodin nejvyšší intenzitu vykazovala skupina kultivovaná v 300nM BPS. Tyto výsledky v souhrnu potvrzují, že působení BPS na organismus způsobuje narušení fungování ER α a může vést k narušení meiotického zrání.

Klíčová slova: prase, oocyt, bisfenol, meiotické zrání, estrogenový receptor

Effect of bisphenol S on expression and localization of estrogen receptors alpha during meiotic maturation of porcine oocytes

Summary

Meiosis is an important complex of processes in the creation of the oocyte capable of fertilization. To be successful, all the factors that participate in meiosis and contribute to its regulation must function properly. Estrogen receptors (ERs) are one of the factors important for the proper development of the oocyte, they act as ligand-activated transcription factors and regulate the transcription of genes affected by estrogens. Although matured oocyte is transcriptionally inactive, ERs are essential in the further development at the onset of transcription in the embryo. Any disruption can lead to serious errors and remove the oocyte from the supply of germ cells. This disruption can be caused by some substances occurring normally in everyday life which can act on the body as the homeostasis disruptors. Such substances as the endocrine disruptors, including the chemical components in the production of plastics – the bisphenols. Previously the bisphenol A (BPA) was widely used but for the harmful effects on the body is gradually being phased out of production and is being replaced by its structural analogs, such as the bisphenol S (BPS). The aim of this thesis was to test the hypothesis whether the BPS negatively affects the course of *in vitro* maturation of porcine oocytes by changes in the expression and intracellular localization of ER α . The hypothesis was verified by immunocytochemical detection of proteins - ER α in the porcine oocytes cultured for 24 and 48 hours in the presence of various concentrations of the BPS. Using images from the fluorescence microscope the localization and relative fluorescence intensity of ER α was monitored. Experiments have shown that the BPS affects the localization of ER α in the porcine oocytes by generating highly homogeneous structure or by the creation of spots of ER α . Another influence of BPS on ER α was their increased expression. In the group cultivated for 24 hours, the highest fluorescence intensity was measured in oocytes cultured with 30 μ M of BPS, whereas at longer cultivation for 48 hours the group cultured in 300 nM of BPS exhibited the highest fluorescence intensity. These results collectively confirm that the action of BPS on the organism causes the disruption of the functioning of ER α and may lead to distortion of meiotic maturation.

Keywords: pig, oocyte, bisphenol, meiotic maturation, estrogen receptor

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Průběh meiotického buněčného cyklu.....	3
3.2	Oogeneze	4
3.2.1	Fáze množení	4
3.2.2	Fáze růstu	7
3.2.3	Fáze zrání	8
3.3	Folikulogeneze	11
3.4	Faktory ovlivňující meiotické zrání.....	14
3.4.1	Regulátory cAMP a cGMP	14
3.4.2	Luteinizační hormon	15
3.4.3	Komplex CDK1/cyklin B – MPF.....	15
3.4.4	Rodina MAP-kináz.....	16
3.4.5	Estrogenové receptory α	16
3.5	Endokrinní disruptory.....	18
3.5.1	Bisfenoly - chemické složení a využití	19
3.5.2	Bisfenol A	20
3.5.3	Substituent - bisfenol S	22
4	Materiály a metodika	24
4.1	Izolace kumulo-oocytárních komplexů	24
4.2	Kultivace v podmínkách <i>in vitro</i>	25
4.3	Imunocytochemie	25
4.4	Analýza obrazu.....	27
4.5	Statistická analýza	27
5	Výsledky	28
5.1	Vliv BPS na expresi a lokalizaci ER α při kultivaci 24 hodin	28

5.1.1	Relativní intenzita fluorescence ER α při kultivaci 24 hodin	30
5.2	Vliv BPS na expresi a lokalizaci ER α při kultivaci 48 hodin	32
5.2.1	Relativní intenzita fluorescence ER α při kultivaci 48 hodin	34
6	Diskuze.....	35
7	Závěr	39
8	Seznam použité literatury a pramenů	40

1 Úvod

Meiotické zrání oocyty je komplexní a velmi přesný soubor procesů, díky kterým se může vyvinout oplození schopná haploidní zárodečná buňka schopná po fertilizaci dát základ novému životu. Jakékoliv narušení těchto dokonale synchronizovaných mechanismů, mezi něž patří například meiotické bloky a jejich regulace, rozpad zárodečného váčku, tvorba meiotického dělicího vřeténka a správné uspořádání chromozomů, signalizace steroidními hormony zprostředkovaná jadernými receptory nebo vydělení pólových tělísek, může mít vážné důsledky.

Estrogenové receptory (ERs) patří do rodiny jaderných receptorů, které po navázání příslušného ligandu působí v jádře jako transkripční faktory. ERs na sebe váží významný steroidní hormon – estradiol, který se podílí na řízení reprodukčních funkcí. Narušení správné funkce těchto receptorů může vážně ovlivnit fungování organismu.

Látky, které mohou narušit průběh meiotického buněčného cyklu, jsou endokrinní disruptory. Mezi ně se řadí dnes velmi diskutované bisfenoly (bisfenol A a jeho substituenty), které jsou používány mimo jiné hlavně v plastových obalech potravin. Jelikož se působení těchto endokrinních disruptorů nelze téměř vyhnout, je důležité, aby jim byla věnována pozornost. V současné době se zvyšuje zájem veřejnosti o bezpečné potraviny. Společnosti vyrábějící obalové materiály potravin jsou proto tlačeny k nalezení náhradních chemických komponent, a tak jsou dnes na trhu stále více oblíbené produkty „BPA free“. Jako substituent BPA je používán například bisfenol S (BPS), nicméně stále je nedostatek odborných studií prověřujících jeho bezpečnost.

Výzkum působení endokrinních disruptorů je prováděn nejen na somatických buňkách, ale často také na oocytech, jelikož jsou k disrupci velmi citlivé. Jako modely jsou používány různé zvířecí druhy, mezi nimi například hospodářská zvířata, laboratorní myši a potkani nebo například z ryb dánío pruhované, kdy se účinkům těchto chemických látek vystavují pouze samostatné buňky nebo i celé organismy. Pro výzkum působení endokrinních disruptorů na člověka se používají lidské tkáňové kultury, ale jako dostupnější model, který se v mnoha aspektech blíží fyziologii lidského organismu, se využívá prase. V této práci byly použity prasečí oocyty, které jsou ve svém fungování, velikosti a délce buněčného cyklu podobné lidským, a proto jsou vhodné i jako model pro humánní medicínu.

2 Cíl práce

Cílem práce je ověřit hypotézu, že bisfenol S negativně ovlivňuje průběh meiotického zrání prasečích oocytů prostřednictvím změn v expresi a lokalizaci estrogenových receptorů alfa.

3 Literární rešerše

3.1 Průběh meiotického buněčného cyklu

Téměř každý eukaryotní organismus produkuje pohlavní buňky (oocyty nebo spermie) prostřednictvím speciálního typu buněčného dělení a tím je meióza. Produktem tohoto děje jsou haploidní pohlavní buňky, tedy buňky s poloviční genetickou výbavou. Následným spojením takovéto samčí a samičí pohlavní buňky vzniká diploidní zygota, základ nového života. Během meiózy je jeden cyklus replikace DNA následován dvěma cykly buněčného dělení, nazývaných meióza I a meióza II. Takto se dosáhne stavu, kdy z jedné diploidní premeiotické buňky vzniknou čtyři haploidní pohlavní buňky (Lodish et al., 2003).

Základní schéma meiózy je u obou pohlaví stejné, nicméně u samců je výtěžnost pohlavních buněk během jejich vzniku větší, jelikož se opravdu z jedné buňky vytvoří během meiózy čtyři pohlavní buňky. U samic je to jiné. Během oogeneze vzniká z jedné buňky pouze jediný plnohodnotný oocyt a dvě až tři pólová tělíska, podle toho, zda se pólové tělísko ve fázi meiózy II rozdělí či ne.

Meióza se skládá ze dvou po sobě jdoucích buněčných dělení. První dělení sestává z profáze I, metafáze I, anafáze I a telofáze I. Někteří autoři (Alberts et al., 2005) rozdělují dvě fáze meiózy ne na čtyři, ale na pět dílčích fází, a to přidáním prometafáze mezi profázi a metafázi. Během prvního meiotického dělení dochází k párování homologních chromozomů a rekombinaci genetické informace díky procesu zvanému crossing-over. Dvě sesterské buňky vzniklé rozdělením té mateřské mají stále diploidní charakter a obsahují každá homologní chromozomy, každý sestávající ze dvou pevně spojených sesterských chromatid. Následně vstupují tyto buňky do meiózy II, sestávající z profáze II, metafáze II, anafáze II a telofáze II. Před vstupem do druhého buněčného dělení nepodstupují dceřiné buňky vzešlé z meiózy I replikaci DNA, a proto jsou konečným produktem celé meiózy haploidní buňky (Cohen and Holloway, 2015).

3.2 Oogeneze

Oogeneze je proces diferenciacie oocyty. Gameta vytvořená procesem oogeneze obsahuje všechny materiály potřebné k zahájení a udržení metabolismu a vývoje. Z toho důvodu, kromě vytvoření haploidního jádra, se při procesu oogeneze hromadí v oocyty množství cytoplazmatických enzymů, mRNA, organel a metabolických substrátů. Tak se oocyt vyvíjí v gametu s pozoruhodně komplexní cytoplazmou (Gilbert, 2000).

3.2.1 Fáze množení

Celý proces oogeneze by nemohl fungovat bez existence zárodečných buněk. Jejich vznik je komplexní proces, který začíná splynutím vajíčka se spermii během oplození a vytvořením první buňky nového život - zygoty. Po několika mitotických cyklech, vytvoření moruly a poté blastocysty, se objevují primordiální zárodečné buňky v procesu gastrulace a to v oblasti mezodermy, mimo embryoblast. Tyto primordiální zárodečné buňky (primordial germ cells – PGCs) jsou společným prekurzorem pro vývin jak samičích, tak i samčích pohlavních buněk (Sun et al., 2014). Nicméně ještě před procesem gastrulace jsou známy buňky, ze kterých se tyto PGCs vyvinuly, a tyto se nacházejí v oblasti epiblastu. Do extraembryonální oblasti se přesunuly zřejmě z důvodu ochrany buněk zárodečné linie před buněčnými signály pro diferenciaci somatických buněk (De Felici, 2013).

Jakmile jsou PGCs specifikovány (od ostatních buněk je lze rozeznat díky značné velikosti a sférickému tvaru), začínají migrovat během rané gastrulace z vnějšku do genitálních lišt vyvíjejících se gonád vznikajícího embrya. Během své cesty tyto buňky dále proliferují a podstupují rozsáhlou genetickou reprogramaci. Aktivují se geny specifické pro linii zárodečných buněk a dochází k epigenetickým změnám genomu zahrnujícím demetylaci DNA a histonů. To vše pro znovu získání schopnosti totipotence a vymazání genového imprintingu. Tyto procesy jsou kompletní po ukončení migrace do genitálních lišt. Po několika dalších proliferačních cyklech dokončí primordiální zárodečné buňky svou diferenciaci v oogonie ve vaječnících u samičího pohlaví, respektive ve spermatogonie ve varleti u samčího pohlaví (De Felici, 2013).

Oogonie jsou velké kulovité buňky obsahující hyaloplazmu, ve které se hlavně kolem jádra shromažďují volné polyribosomy, mitochondrie a krátké úseky endoplazmatického retikula.

Mitochondrie jsou v tomto stádiu vývoje spíše kulovité s úzkými, téměř tubulárními kristami (Bielańska-Osuchowska, 2006). Mitochondrie jsou jedinečnými organelami díky své schopnosti pokrýt okamžité metabolické požadavky vyvíjejícího se embrya a také tím, že předávají mitochondriální genom další generaci (Albertini, 2015). Jádro oogonie je také sférického charakteru, obsahuje nukleoplazmu a krátké úseky heterochromatinu. Během rané fáze vývoje vaječníku se oogonie mitoticky dělí a počet zárodečných buněk výrazně narůstá. Později se oogonie začínají shlukovat do skupin a propojují se mezi sebou intercelulárními cytoplazmatickými můstky. Mitotická aktivita ustává a dochází opět ke snížení počtu zárodečných buněk, které zanikají nektrózou nebo později v profázi I degenerují. Jakmile vstoupí oogonie do profáze prvního meiotického dělení, cytoplazmatické můstky se přeruší a nadále jsou tyto buňky nazývány jako oocyty (Bielańska-Osuchowska, 2006).

Oocyty nacházející se v profázi I se nazývají primární. Tato fáze se skládá z několika po sobě jdoucích dílčích fází – leptotene, zygotene, pachytene a diplotene, ve které dochází k prvnímu meiotickému bloku. Zároveň při dosažení této dílčí fáze se oocyt začíná obklopotovat jednou vrstvou pre-granulózních buněk a vzniká bazální membrána. Takto vzniká první kategorie folikulů - primordiální folikuly, které zůstávají v klidovém stádiu, dokud nepřijde signál, který je stimuluje k růstu (Fair, 2003).

Během profáze I dochází v oocytu k důležitým procesům týkajících se genetické informace. V leptotenní fázi se párují homologní chromozomy, které následně ve fázi zygotene vytvářejí tzv. synaptonemální komplex, což je podélné spojení homologních chromozomů. Tento komplex určí místa rekombinace a pravděpodobně vytváří i jakousi kostru pro restrikcii dvouvláknové DNA během procesu crossing-over. Během pachytenní fáze dojde k samotnému crossing-overu. V následné diplotenní fázi dochází k rozvolnění synaptonemálního komplexu, ovšem s viditelnými chiasmaty (místy překřížení při crossing-overu). V této fázi je vývoj oocytu zastaven a ten takto s dekonenzovaným chromatinem zůstává (Jones, 2008).

Při přeměně v oocyt dochází v cytoplazmě ke změnám. Objevují se protáhlé mitochondrie, stále s malým množstvím krist, nejspíš kvůli nízké metabolické aktivitě (Plant and Zeleznik, 2015). Krátké úseky endoplazmatického retikula se začínají shlukovat a vytvářejí skupiny dvou až tří paralelně uspořádaných podlouhlých cisteren a objevují se také hladké membránové struktury. Na konci fáze pachytene jsou již změny v cytoplazmě výraznější. Zvyšuje se množství protáhlých mitochondrií, dlouhých paralelních cisteren endoplazmatického retikula,

kteře začínají vytvářet složitější sítě, membránových struktur, lysozomů a v tomto stádiu vznikají také lipidová granula (Bielańska-Osuchowska, 2006).

Důležitým znakem savčího oocytu je velké jádro, které se v období profáze I nazývá zárodečný váček (germinal vesicle – GV). Může být lokalizováno v centru oocytu nebo v excentrické poloze. Obsahuje různé množství jadérek a chromatin v podobě kondenzovaného heterochromatinu nebo difuzního euchromatinu. Přechod mezi heterochromatinem a euchromatinem je závislý na míře transkripce během růstu oocytu. Jaderný obal zárodečného váčku je bohatý na jaderné póry, což umožňuje přechod velkého množství RNA během následné fáze růstu (Albertini, 2015).

Nepostradatelnými komponentami pro správnou funkci buněčného jádra jsou laminy. Tvoří vrstvu mezi jadernou membránou a periferním heterochromatinem, která se nazývá jaderná lamina. Tato vrstva je tvořena třemi hlavními strukturálními polypeptidy – laminem A, B a C, které patří mezi intermediální filamenta typu V. Laminy typu A, laminy A a C, jsou produktem jednoho genu LMNA a vznikly díky alternativnímu sestřihu. Laminy vytváří kostru jádra, která drží jeho tvar, zajišťuje jeho mechanické vlastnosti a slouží jako místo k navázání chromatinu a proteinů účastnících se reorganizace chromatinu (Dechat et al., 2010; Qi et al., 2015).

Názory na definitivní počet zárodečných buněk při narození jedince se různí. Jediná dříve platná teorie popisovala, že během fetálního období se ve vaječníku vytvoří definitivní zásoba zárodečných buněk, ze kterých se během reprodukční fáze života vybírají buňky pro stvoření nového jedince. Tuto zásobu představují primordiálními folikuly, které obsahují oocyt zastavený v prvním meiotickém bloku obklopený jednou vrstvou plochých pre-granulózních buněk (Adhikari and Liu, 2013). Přestože je tato teorie obecně přijímaná, existují také studie, které potvrzují, že se nové zárodečné buňky mohou vytvářet i v postnatálním období (Johnson et al., 2004).

Zásoba zárodečných buněk se během života jedince progresivně snižuje. Proto, aby oocyt uvnitř primordiálního folikulu mohl sloužit jako zdravá zárodečná buňka schopná oplození, musí si zachovat vysokou cytoplazmatickou a genetickou kvalitu. Způsob, jak tento problém vyřešit, je použití celé řady nástrojů pro opravu poškození v buňce (hlavně poškození DNA) a pokud to není možné, musí primordiální folikul obsahovat proapoptotické proteiny, které odstraní poškozený oocyt ze zásoby zdravých zárodečných buněk (Myers and Hutt, 2013).

3.2.2 Fáze růstu

Během růstové fáze je stále zastaven buněčný cyklus a oocyt zůstává v profázi I. Důležité je zmínit, že růstová fáze je nezávislá na stimulaci gonadotropiny, kdežto fáze zrání je ovlivňována působením gonadotropních hormonů (Albertini, 2015).

Nejnápadnějším znakem savčího oocyty je jeho velikost. Přeměna z malého oocyty uvnitř primordiálního folikulu do plné velikosti je perfektní ukázkou buněčné hypertrofie. Extrémní zvětšení objemu oocyty je způsobeno transkripční aktivitou jádra, syntézou proteinů a hyperplazií buněčných organel. Nově vznikající molekuly RNA a proteiny jsou důležité pro tzv. housekeeping (zajištění základních pochodů) a pro udržení procesu hypertrofie, dále ovlivňují proces meiózy a také jsou důležité pro pozdější stadia vývoje jako působení tzv. maternálních genů (Albertini, 2015).

Strukturální změny v cytoplazmě během růstu oocyty zahrnují nárůst počtu a změnu morfologie mitochondrií, ultrastrukturální modifikace Golgiho aparátu a akumulaci ribozomů. Hlavní nukleární změnou je transformace jádérka, které se mění z difúzní, síťovité podoby na kompaktní, jednotnou strukturu složenou výlučně z fibrilárního materiálu. Tyto modifikace jsou odrazem intenzivní syntézy RNA, která postupně ustává s růstem oocyty. Pro vysokou transkripční aktivitu je také důležitá struktura chromatinu, která je v rostoucím oocyty rozvolněná, oproti kompaktnímu chromatinu obklopujícímu jádérko u oocyty s ukončenou růstovou fází. Pro následující vývoj a rozdělení jádra při meióze se musí vytvořit dělicí vřeténko, jehož vývoj se započíná ve stadiu růstu oocyty, kdy v plně narostlém oocyty se v perinukleárním prostoru nachází mikrotubuly organizující centrum (MTOC), ze kterého ve fázi zrání vyrůstají mikrotubuly při dělení buňky (Fulka et al., 1998).

Během oogeneze působí Golgiho aparát jako kontrolní centrum syntézy proteinů, endosomů, kortikálních granul a lysozomů. Primární funkcí Golgiho aparátu, která začíná po aktivaci folikulu, je sekrece. Hlavními produkty jsou v této fázi glykoproteiny, ze kterých bude vytvořena zona pellucida, poté membránové proteiny pro rozvíjející se plazmatickou membránu a proteiny, které jsou nutné pro formování lysozomů. Během růstu oocyty se Golgiho komplex rozmístí jak uvnitř cytoplazmy, tak také těsně pod plazmatickou membránou oocyty, kde se podílí na tvorbě kortikálních granul (Albertini, 2015).

Během růstu oocyty se začíná tvořit zona pellucida (Sathananthan et al., 2006). Je to extracelulární matrix obklopující oocyt, která má mnoho funkcí. Je složena z glykoproteinů (ZP1, 2, 3) syntetizovaných, zpracovávaných a sekretovaných samotným oocytem. Slouží hlavně jako ochranná bariéra oocyty uvnitř folikulu, během ovulace a fertilizace (Albertini, 2015).

Aby mohl oocyt prolomit meiotický blok a dokončit zrání, musí získat meiotickou kompetenci. To vyžaduje sérii strukturálních a funkčních změn samotného oocyty a obklopujících kumulárních buněk. Kompetence oocyty je možné dosáhnout až po dokončení růstu folikulu. Další procesy nutné k dokončení meiózy, jako je redistribuce kortikálních granul nebo změny v počtu, funkci a rozmístění mitochondrií v cytoplazmě, se poté realizují postupně až do konečných fází zrání (Picton et al., 2008). Oocyt může dosáhnout meiotické kompetence až po dosažení své téměř maximální velikosti. Prasečí oocyt ve své růstové fázi změny velikost z 30 až na 120 μm a jejich růst je téměř ukončen (115 μm) ve folikulech o velikosti 1,8 mm. Schopnost dokončit v pozdějším vývoji meiózu I a přejít tak do dalšího zracího dělení je také podmíněna ukončení transkripční aktivity jádra během růstové fáze (Hunter, 2000).

3.2.3 Fáze zrání

Zrání oocyty je proces, ve kterém plně dorostlý oocyt dokončuje vývoj započatý během fetálního období, aby se mohl stát oplození schopnou gametou (Trounson et al., 2013). Poznání procesů této fáze je velmi důležité při experimentech *in vitro*, kdy vytvoření optimálních podmínek pro zrání je základní podmínkou pro produkci oocytů schopných oplození a dalšího embryonálního vývoje (Yuan and Krisher, 2012).

Po dosažení puberty, kdy je samice připravena se rozmnožovat, se v pravidelných intervalech estrálního cyklu začíná z hypofýzy uvolňovat luteinizační hormon, který nastartovává přerušenu meiózu. Obnovení meiózy je charakteristické rozpadnutím zárodečného váčku – tzv. germinal vesicle breakdown (GVBD) (Mehlmann, 2013). Rozpad lze rozdělit do čtyř stádií označovaných GV1 až GV4, podle změn chromatinu a přítomnosti jádérka a jaderné membrány. Na začátku rozpadu ve stádiu GV1 jsou jaderná membrána i jádérka ještě viditelné a chromatin vytváří kolem jádérka kruh nebo strukturu podobnou koňské podkově. Ve stádiu GV2 se na jaderné membráně objevují shluky chromatinu. Ve stádiu GV3 jsou shluky chromatinu zřetelné hlavně kolem jádérka a začíná se tvořit síť

chromatinových filament. V konečné fázi GV4 je již jaderná membrána nezřetelná a jadérka již nelze rozeznat. Chromatin je ve formě nepravidelné sítě nebo jako jednotlivé kondenzované bivalenty (Motlík and Fulka, 1976).

Rozpad jaderné membrány, který je nezbytný pro GVBD, je způsoben fosforylací všech tří typů laminů (A, B i C). Laminová filamenta depolymerizují a vytvářejí jednotlivé dimery. Tato dezintegrace laminové sítě vede k fragmentaci celé jaderné membrány na malé váčky. Stejně se rozpadá i endoplazmatické retikulum, které obklopuje vnější jadernou membránu (Miyano et al., 2003).

Chromozomy kondenzují a formuje se meiotické dělicí vřeténko. Z profáze I se chromozomy nacházejí ve formě vždy dvou spojených homologů, tzv. bivalent. V prometafázi vytvářejí kinetochory sesterských chromatid oproti mitotickému dělení funkční jednotku, která je připojená pouze ve směru jednoho pólu dělicího vřeténka. Nicméně uvnitř bivalentu jsou každá dvojice sesterských chromatid připojená k opačnému pólu. Jakmile jsou kinetochory jednotlivých chromozomů připojeny k dělicímu vřeténku a srovnány v ekvatoriální rovině, může začít anafáze, kdy se jednotlivé homologní chromozomy rozcházejí k opačným pólům oocyty. Během telofáze se následně vydělí první pólové tělísko a vzniká tak sekundární oocyt (Jones et al., 2013).

V procesu buněčného dělení hrají významnou roli jednotlivé komponenty cytoskeletu. Meióza je totiž asymetrické dělení, kdy chromozomy sice musejí být rozděleny přesně na dvě poloviny, kdežto cytoplazma je dělena nesymetricky a to ve prospěch oocyty, nikoliv pólového tělíška. Tato asymetrie dovoluje zachovat maternální mRNA, proteiny a živiny v cytoplazmě, které se akumulovaly během růstové fáze, a jsou důležité pro časný embryonální vývoj před nidací blastocysty v děloze (Verlhac and Breuer 2013).

Jednou z cytoskeletárních struktur jsou mikrotubuly dělicího vřeténka. Po rozpadu jaderné membrány začnou z MTOC růst mikrotubuly směrem k chromatinu a poté se MTOC začnou stahovat k opačným pólům oocyty. Přejídná spojení mezi mikrotubuly a kinetochory chromozomů posouvají chromozomy do ekvatoriální roviny mezi dvěma póly dělicích vřetének. Jakmile jsou dělicí vřeténka s plně funkčními póly vytvořeny, může začít anafáze, kdy se bivalenty rozcházejí k opačným pólům oocyty (Verlhac and Breuer 2013). MTOC se podílí nejen na tvorbě meiotického vřeténka, ale podporují také mitotické dělení buněk během raného embryonálního vývoje. MTOC se skládá z gama-tubulinu a pericentrinu, které

prodělávají specifické změny během vývoje oocyty ze stádia GV až do metafáze II (Albertini, 2015). Centrioly tvořící centrozomy se během vývoje degradují. Uvnitř oogonií lze centrioly nalézt, kdežto uvnitř oocytů v primordiálních a primárních folikulech zastavených v profázi I nejsou centrioly detekovatelné. Až po oplození aktivuje centrozom spermie oocyt a vytváří se hvězdovitá struktura a mitotické vřetenko embrya (Sathananthan et al., 2006).

Vedle mikrotubulů existují ještě další 2 třídy cytoskeletárních proteinů, které jsou důležité v životě savčího oocyty. Jsou to filamenta kontraktilního proteinu aktinu, poté tzv. motorový protein myozin a proteiny vytvářející intermediální filamenta, která dodávají buňce pevnost (Albertini, 2015). Co se týče asymetrie dělení, pro tu je důležitý F-aktin. Síť tvořená tímto aktinem kontroluje přesun meiotického vřetenka během meiózy. Během profáze se jádro nachází v centrální části oocyty a kolem něj je hustá síť aktinových vláken. Jakmile dojde k rozpadu jaderné membrány, začne se tvořit dělicí vřetenko ve stejné oblasti, kde se nacházelo jádro. V této fázi se výrazně sníží hustota aktinových vláken a znovu se obnoví během migrace dělicího vřetenka ke stěně oocyty. Aktinová síť se dynamicky přetváří, aby tak umožnila přemístění chromozomů s dělicím vřeténkem z centrální polohy na okraj buňky. Na jedné části stěny oocyty je aktinová síť zesílena a tvoří tzv. aktinovou čepičku, která udržuje strukturu chromozomů a dělicího vřetenka na místě. Zde během anafáze dojde k vydělení pólového tělíska (Verlhac and Breuer, 2013). Přestavba proteinové sítě tvořené intermediálními filamenty je důležitá pro mnoho biochemických procesů v oocyty. Umožňuje změnu rozmístění organel během různých fází vývoje, tvoří signální dráhy, díky kterým oocyt zůstává nebo naopak přerušuje meiotický blok a také umožňuje posun meiotického vřetenka (Albertini, 2015).

Další strukturou v cytoplazmě oocyty je tzv. *annulate lamellae*. Je to organela tvořená membránami podobnými endoplazmatickému retikulu, které jsou proděravěné mnoha póry. (Pavelka and Roth, 2010) Tato struktura je využita po fertilizaci k vytvoření jaderných membrán u vznikajících blastomer (Albertini, 2015).

Po ukončení meiózy I nastupuje ihned druhé zrací dělení. Na začátku druhého dělení nedochází k replikaci DNA. Jednotlivé chromozomy se seřadí v ekvatoriální rovině, kinetochory jednotlivých sesterských chromatid se navazují na opačné póly dělicího vřetenka a vytvářejí tak strukturu typickou pro metafázi II (Alberts et al., 2005). Zde se zrání zastaví v druhém meiotickém bloku a oocyt čeká na oplození spermií, která tento blok zruší, dokončí se druhé zrací dělení a vydělí se druhé pólové tělísko.

3.3 Folikulogeneze

Stejně jako oogeneze, i vývoj folikulu začíná během fetálního období jedince. Jakmile oocyt dosáhne dílčího stádia diplotene, začne se obklopotvat jednou vrstvou čtyř až osmi pre-granulózních buněk a vzniká také bazální membrána. Původ těchto prekurzorů granulóznic buněk není zcela jistý, mohou být z mezonefros, mezoteliálního původu nebo obojí. Takto se formuje první kategorie folikulů, tzv. primordiální folikuly (Fair, 2003).

Aby mohl folikul poskytnout zralý oocyt, musí podstoupit změnu z primordiálního na primární folikul. Tento proces je nazýván jako aktivace primordiálního folikulu a je charakterizován dramatickým růstem samotného oocytu, což je doprovázeno proliferací a diferenciací pre-granulózních buněk, obklopujících tento oocyt. Vrstva několika málo zploštělých pre-granulózních buněk je diferencována ve vrstvu většího množství kubických granulóznic buněk. Mezi jednotlivými stádii folikulů jsou primordiální folikuly převládající a v klidovém stádiu mohou vydržet měsíce, roky až desetiletí (podle daného živočišného druhu). Z klidové fáze se ovšem nedostanou všechny primordiální folikuly. Jen zlomek folikulů je schopen dojít až do stádia ovulace a poskytnout oocyt pro oplození. Primordiální folikul mohou potkat tři možné osudy. Buď může přetrvávat v klidovém stavu, nebo může dojít k atrezii, a to přímo z klidového stavu nebo až po folikulární aktivaci. Třetím možným osudem, který potká jen limitované množství primordiálních folikulů je aktivace a přeměna v primární folikul (Adhikari and Liu., 2013).

Zásoba primordiálních folikulů je v klidovém stádiu držena díky působení inhibitorů. Pokud klesne jejich vliv, nebo naopak stoupne vliv stimulačních faktorů, folikuly se aktivují (Kim, 2012). Inhibitory působí na folikul synergicky a jakákoliv nižší aktivita jednoho z inhibitorů způsobí předčasnou aktivaci primordiálního folikulu. Regulace tedy spočívá v udržení těchto folikulů v klidové fázi. Stimulátory potřebné pro spuštění aktivace fungují na principu potlačení aktivity jednoho či více inhibitorů, čímž je primordiálním folikulům umožněno dostat se z klidového stavu. Nicméně mechanismus výběru folikulů, které zůstanou v klidovém stavu, které se aktivují nebo které zaniknou, není ještě zcela znám (Adhikari and Liu, 2013). Důležitá pro folikulární aktivaci je také vzájemná komunikace oocytu a somatických granulóznic buněk kolem něj. Faktory, které ovlivňují proliferaci granulóznic buněk, pravděpodobně ovlivňují také samotnou aktivaci primordiálního folikulu (Fair, 2003). Tato obousměrná komunikační dráha je využívána jak oocitem, který potřebuje pro svůj růst signály, růstové

faktory a živiny z vnějšku, tak granulózními buňkami pro jejich proliferaci a diferenciaci. V období vzniku primárních folikulů se navíc mezi oocytem a granulózními buňkami začínají tvořit mezibuněčné kanály – tzv. gap junctions, které napomáhají v komunikaci prostřednictvím snadnější výměny menších molekul, jako jsou živiny, ionty nebo sekundární buněčné poslové (Liu et al., 2006).

Ne všechny folikuly jsou ovšem předurčeny k růstu. Po zformování folikulů na vaječniku dochází k tzv. iniciálnímu recruitmentu, kdy je ze zásoby primordiálních folikulů vybrána část, která projde aktivací, zatímco ty ostatní zůstanou v klidovém stádiu. Tento proces je kontinuální, začíná před narozením jedince a pokračuje po celou reprodukční fázi života. Hlavní událostí následující po iniciálním recruitmentu při současném růstu folikulu, je růst samotného oocytu (McGee and Hsueh, 2000).

Vývojová stádia folikulů lze rozdělit do dvou skupin, a to na preantrální a antrální folikuly. Aktivaci primordiálních folikulů je nastartována růstová fáze oocytů, která trvá po dobu vývoje preantrálních stádií folikulů. S růstem oocytu rostou také granulózní buňky tvořící folikul. Tak se z primárního folikulu vyvine sekundární, kdy se granulózní buňky stávají citlivé k působení gonadotropního hormonu FSH (folikulostimulační hormon). Zpočátku rostou oocyt a granulózní buňky lineárně stejnou rychlostí, ale po dosažení konečné velikosti oocytu začíná folikul růst rychleji. Hormon FSH podporuje růst folikulu, který díky mitotickému dělení granulózních buněk roste rychleji. Uvnitř folikulu v mezibuněčných prostorech mezi granulózními buňkami se začnou tvořit malé ostrůvky naplněné folikulární tekutinou, které se postupně spojují a vytvářejí dutinu, tzv. antrum a takto vzniká terciární nebo také antrální folikul (Assidi and Sirard, 2013). U prasat je antrum vyvinuto u folikulů o velikosti cca 0,5 mm, nicméně oocyt v tomto stádiu dosahuje pouze $\frac{3}{4}$ své konečné velikosti, oproti většině savců, kdy je oocyt již plně narostlý (Motlík and Kubelka, 1990).

Důležitým znakem k rozpoznání folikulárního stádia jsou kumulární buňky. V preantrálních stádiích tyto buňky chybí. V antrálních stádiích se formuje nejen antrum, ale také se diferencují preantrální granulózní buňky. Vznikají dva podtypy buněk a to murální granulózní buňky, které se nacházejí blízko bazální laminy folikulu, a kumulární buňky, které obklopují oocyt. Tato diferenciací je vyvolána především stimulací FSH. Nejvnitřnější vrstva kumulárních buněk je známá jako corona radiata a vytváří intimní kontakt se zónou pellucidou (Assidi and Sirard, 2013). Bazální lamina přiléhající k vnější vrstvě granulózních buněk je zároveň odděluje

od další vrstvy buněk a to thékálních, které tvoří poslední vnější vrstvu folikulu a dělí se na *theca folliculi externa* a *interna* (Richards et al., 2015). V antrálním stádiu dosahuje zona pellucida své konečné diferenciaci a kumulární buňky vytváří s oocytem tzv. kumulo-oocytární komplex (COC – cumulus-oocyte complex), který zaujímá pozici na periferní části folikulu, pravděpodobně jako přípravu na nadcházející ovulaci (Assidi and Sirard, 2013).

Předovulační savčí folikul je složený z meioticky kompetentního oocyty, zastaveného v profázi I, obklopeného dvěma typy granulózních buněk, a to těsně kolem oocyty kumulárními buňkami a na povrchu folikulu murálními granulózními buňkami, které jsou od sebe oddělené antrální dutinou, naplněnou folikulární tekutinou. Komunikace mezi jednotlivými buňkami je zprostředkována pomocí gap junctions, což je důležité pro udržení meiotického bloku (Mehlmann, 2013).

K prolomení prvního meiotického bloku oocyty je nutný signál z hypofýzy v podobě vlny luteinizačního hormonu (LH). Ke konci folikulárního růstu stimuluje jiný hypofyzární hormon FSH expresi receptorů pro LH na murálních granulózních buňkách folikulu. LH receptory nejsou na kumulárních buňkách, ani na samotném oocyty, proto LH stimulace při obnovení meiózy nemá přímý efekt na oocyt (Mehlmann, 2013).

Zánik folikulu je součástí procesu ovulace. Aby byla ovulace úspěšná, musí po stimulaci hormonem LH dojít k pěti klíčovým událostem. Je to expanze COC, přerušení spojení gap junction mezi buňkami, obnovení meiózy oocyty, uvolnění COC z povrchu vaječníku a nakonec luteinizace buněk zbylých z prasklého folikulu. Při procesu expanze je syntetizováno množství kyseliny hyaluronové, která naplňuje antrální dutinu, dostává se mezi kumulární buňky a spolu tvoří kolem oocyty soudržnou síť, což je nezbytné pro uvolnění oocyty z vaječníku. Tato extracelulární matrix poskytuje nezbytné prostředí při *in vivo* oplození (Mlynářčiková et al., 2009). Přerušení spojů gap junction usnadňuje přerušování meiotického bloku regulací hladin cAMP a cGMP, což bude vysvětleno v následující podkapitole. Ačkoliv je ovulace často popisovaná jako „erupce“, jedná se spíše o pomalý proces, kdy se oocyt obklopený kumulárními buňkami spojenými kyselinou hyaluronovou uvolňuje z vaječníku. Expandovaný COC musí projít vrstvou murálních granulózních buněk, bazální membránou, vrstvou thékálních buněk a epitelem pokrývajícím vaječník. Zbylé buňky folikulu pak procházejí procesem luteinizace, což je definitivní konec folikulu (Richards et al., 2015).

3.4 Faktory ovlivňující meiotické zrání

Během meiózy existuje několik fází, které jsou regulovány následujícími činiteli. Aktivace a správné působení těchto činitelů hraje významnou roli během meiotického zrání oocytů (Kim et al., 2011). Mezi nejvýznamnější úseky vývoje patří fáze zárodečného vajíčku nebo také blok v profázi I, který trvá po většinu života oocyty. Poté je to fáze obnovené meiózy I, která nastupuje po LH vlně. Tato část trvá oproti první fázi pouze několik hodin. V této fázi dochází k segregaci homologních chromozomů (nebo také bivalentů), dokončuje se první meiotické zrání s vydělením prvního pólového tělíska. Třetí fáze začíná několik hodin před ovulací a vyznačuje se znovu zastavením meiózy tentokrát v metafázi II. Většina oocytů v této fázi degeneruje bez oplození. Jen některé oocyty jsou oplozeny spermii, čímž je přerušena druhá meiotická fáze a dokončena druhá meióza. Oocyt se konečně stává haploidní buňkou, než se spojí s jadernou informací spermií, kdy vzniká diploidní zygota (Jones et al., 2013).

3.4.1 Regulátory cAMP a cGMP

Meiotický blok je regulován několika cestami. Jednou z nich je hladina cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) uvnitř oocyty, který reguluje jak meiotický blok tak obnovení meiózy. Uvolnění oocyty z folikulu způsobuje spontánní znovu obnovení meiózy, což je spojeno s poklesem hladiny cAMP uvnitř oocyty. Toto spontánní zrání může být inhibováno inkubací oocyty s fosfodiesterovými inhibitory nebo analogy cAMP. Během meiotického bloku jsou hladiny cAMP poměrně vysoké a poklesnou až jako odpověď na LH vlnu, která vyvolá obnovení meiózy (Mehlmann, 2013).

Pro regulaci meiotického bloku jsou důležité také granulózní a kumulární buňky. I když produkcí cAMP je oocyt schopen udržet se v profázi I, při uvolnění oocyty z folikulu dojde ke spontánnímu zrání, takže tato jediná regulace nestačí. Folikulární buňky musí dodávat oocyty nějaký inhibiční faktor, který se do oocyty dostává skrze gap junctions, a LH vlna zruší efekt tohoto inhibitoru buď zastavením jeho produkce nebo uzavřením gap junctions, přes které inhibitor difunduje do oocyty (Mehlmann., 2013).

Bylo zjištěno, že tímto inhibičním faktorem je další cyklický nukleotidmonofosfát, a to cyklický guanosinmonofosfát (cGMP). Jeho hladina uvnitř oocyty klesá při vyjmutí oocyty z folikulu, nebo po LH vlně. Inhibičním působením cGMP na fosfodiesterázovou aktivitu

uvnitř oocyty, čímž se zabrání hydrolýze cAMP, je oocyt udržen v meiotickém bloku. Naopak inhibováním enzymu potřebného k produkci cGMP (inosinmonofosfát dehydrogenáza) se navýší aktivita fosfodiesterázy, což snižuje hladinu cAMP uvnitř oocyty, aktivuje se MPF a dochází ke znovu nastartování meiózy a rozpadu zárodečného váčku u oocyty, který se stále nachází uvnitř folikulu, jelikož cGMP difunduje přes gap junctions právě z folikulárních buněk (Mehlmann, 2013).

3.4.2 Luteinizační hormon

Jak už bylo zmíněno, luteinizační hormon (LH) stimuluje oocyt k obnovení meiózy. Nejprve se LH naváže a aktivuje LH receptory na membránách granulárních buňkách. Navázaný hormon stimuluje aktivitu adenylátcyklázy, a tím se zvýší produkce cAMP uvnitř granulárních buněk. Paradoxně zvýšení produkce cAMP u folikulárních buněk vede ke snížení jeho produkce uvnitř oocyty. Navázáním LH na jiný receptor se aktivuje fosfolipáza C, což vyústí ve zvýšenou hladinu Ca^{2+} . V *in vitro* podmínkách lze obnovit meiózu pomocí zvýšené hladiny Ca^{2+} a také se předpokládá, že tento signál je důležitý pro obnovení meiózy pomocí FSH u kumulo-oocytárního komplexu (Mehlmann., 2013).

Luteinizační hormon ovlivňuje obnovení meiózy i dalšími způsoby. Snižuje propustnost gap junctions mezi folikulárními buňkami, což následně vede ke snížení cGMP uvnitř oocyty. Snížení cGMP, způsobené uzavřením gap junctions, vede k aktivaci fosfodiesterázy, hydrolýze cAMP a může tak být zrušen meiotický blok. Stimulace LH může také přímo ovlivnit hladinu cGMP, kdy při poklesu opět dochází i ke snížení cAMP a meióza se obnovuje (Mehlmann, 2013).

3.4.3 Komplex CDK1/cyklin B – MPF

Hladina cAMP uvnitř oocyty reguluje meiotický blok ovlivněním rovnováhy mezi inaktivním a aktivním proteinovým komplexem tvořeným cyklinem B a cyklin-dependentní kinázou (CDK1). Když jsou hladiny cAMP vysoké, je aktivována protein kináza A (PKA). Ta prostřednictvím specifických drah a dalších enzymů způsobí fosforylaci tyrozinů a threoninů uvnitř CDK1, což vyústí v inaktivaci této kinázy. Naopak nízké hladiny cAMP, které se objevují po vystavení působení hormonu LH nebo u oocytů uvolněných z folikulu, způsobují snížení aktivity PKA a následnou defosforylaci tyrozinů a threoninů uvnitř CDK1,

a tím aktivaci komplexu CDK1/cyklin B (Mehlmann., 2013). Tento proteinový komplex, nazývaný jako MPF (meiosis promoting factor, mitosis promoting factor nebo metaphase promoting factor), je odpovědný za rozpad zárodečného váčku, kondenzaci chromozomů a formaci meiotického vřeténka, procesy, které jsou životně důležité pro úspěšné oplození a raný embryonální vývoj. I když je pro meiotické zrání důležitá aktivita MPF, k překonání meiotických bloků je nutný pokles aktivity tohoto komplexu (Hunter, 2000).

3.4.4 Rodina MAP-kináz

Kromě MPF hrají důležitou roli při znovuzahájení meiózy také další kinázy, které spouštějí svou aktivitu před nebo společně s MPF. Jednou skupinou těchto kináz jsou mitogeny-aktivované protein kinázy (MAPK), které fosforylují cytoskeletární proteiny a jaderné laminy, což hraje důležitou roli při dělení buňky. Aktivita MAP kinázy se zvyšuje až do metafáze II a zůstává vysoká i při poklesu MPF. Na rozdíl od MPF zůstává aktivita MAPK vysoká i při vydělení pólového tělíska (Hunter, 2000).

3.4.5 Estrogenové receptory α

Pro řízení funkcí reprodukční soustavy jako celku, tak i pro samotnou oogenezi a folikulogenezi jsou důležité steroidní hormony. Aby mohly působit, je nutné, aby byly v organismu správné receptory pro přijetí signálu v podobě hormonu. Velkou skupinu tvoří tzv. jaderné receptory. Tato rodina receptorů je velmi rozsáhlá a plní mnoho různých funkcí. Je členěna do několika tříd a právě třída I zahrnuje steroidní receptory. Mezi ně patří estrogenové receptory (ERs), progesteronové receptory (PRs), androgenové receptory (ARs) a glukokortikoidní receptory (GRs) (Binder et al., 2015).

Jelikož je estradiol hlavní steroidní hormon produkovaný předovulačním folikulem, je důležitá přítomnost ERs a nedostatek estradiolu v počátečních fázích zrání oocyty může vyústit v závažné vývojové poruchy (Hunter, 2000). ERs jsou dvojího typu ER α a ER β . Tyto receptory lze nalézt v celé reprodukční soustavě, v děloze, na vaječnicích i ve folikulárních buňkách a uvnitř samotného oocyty. Mechanismus účinku těchto receptorů se odvíjí od vlastností ligandů, které se na ně váží. Steroidní hormony jsou lipofilního charakteru a mohou tedy volně difundovat přes membrány, a proto nemusí být receptory na membránu navázané a jsou tedy rozptýlené v cytoplazmě buňky nebo uvnitř jádra. Bez navázaného ligandu jsou receptory

v inaktivní formě, teprve až po navázání hormonu, který způsobí konformační změnu receptoru, jsou schopné vytvářet dimery a interagovat s chromatinem. U ER α se aktivovaný receptor v jádře váže zprostředkovaně na požadovanou oblast DNA (určitý gen) přes další transkripční faktory. Poté tento komplex DNA-receptor může ovlivňovat expresi daného genu (Binder et al., 2015).

3.5 Endokrinní disruptory

Endokrinní disruptory (endocrine-disrupting chemicals – EDCs) jsou popisovány jako exogenní chemikálie nebo jejich směsi, které nějakým způsobem zasahují do hormonálního systému. I když výsledkem jejich akce je narušení normálního fungování hormonálního systému, způsob, kterým toho dosahují, se mnohdy velmi liší. Endokrinní disruptory jsou nebezpečné také tím, že nejsou specifické, a proto mohou působit na různé systémy (Sweeney et al., 2016).

Jednou z cest, jak endokrinní disruptory pracují, je navázání na jaderné receptory. Tímto způsobem přímo aktivují (agonisté) nebo inhibují (antagonisté) tyto receptory a nepřímo regulují hormonální metabolismus. Takto ovlivňují endokrinní disruptory organismus na genomické úrovni. Pokud jsou lipofilního charakteru, mohou projít přes membránu do nitra buňky, navázat se na jaderné receptory, které po aktivaci působí jako transkripční faktory, a takto regulovat genovou expresi a následně i buněčné funkce. Další způsob, jak endokrinní disruptory zasahují do chodu organismu, je prostřednictvím negenomické signalizace. Tento způsob nevyžaduje navázání aktivovaného jaderného receptoru na DNA a realizuje se v cytoplasmě buňky nebo navázáním na membránové receptory. Dalším rozdílem mezi negenomickým a genomickým působením je rychlost. Negenomická signalizace se projevuje v řádech vteřin a minut, oproti hodinám až dnům. Endokrinní receptory hydrofilní povahy, které neprojdou membránou buňky, tak mohou také regulovat metabolismus, aniž by pro svou funkci vyžadovaly navázání na jaderné receptory. Negenomickou signalizací je řízena například intracelulární hladina iontů Ca, aktivace protein kinázy, která vede k tvorbě sekundárního buněčného posla inositol fosfátu (IP₃) nebo aktivace receptorů pro růstové faktory. Všechny tyto dráhy mohou být narušeny působením endokrinních disruptorů. Třetí možností ovlivnění organismu endokrinními disruptory je jejich působení na epigenetické úrovni. Epigenetika vysvětluje dědičné změny exprese genů a fenotypů, které ovšem nejsou podmíněny změnou sekvence DNA. Epigenetické změny jsou důležité v prenatálním vývoji, kdy všechny buňky začínají se stejnou DNA, ale pak jsou schopny se specializovat. Částečně ovlivňuje vývoj i okolní prostředí, organismus se tedy může setkat i s endokrinními disruptory, které mohou narušit epigenetické procesy, jakými jsou DNA metylace a modifikace histonů. Potenciálním terčem pro endokrinní disruptory mohou být také bílkoviny, které se podílejí na udržení rovnováhy steroidních hormonů. Z bílkovin jsou tvořeny enzymy, které mají

na starosti aktivaci, transformaci a eliminaci hormonů, respektive i endokrinních disruptorů. Narušení rovnováhy hormonů cirkulujících v organismu a hladin v jednotlivých tkáních může mít za následek vývojové vady a narušení fungování reprodukčního traktu v dospělosti (Greathouse and Walker, 2010).

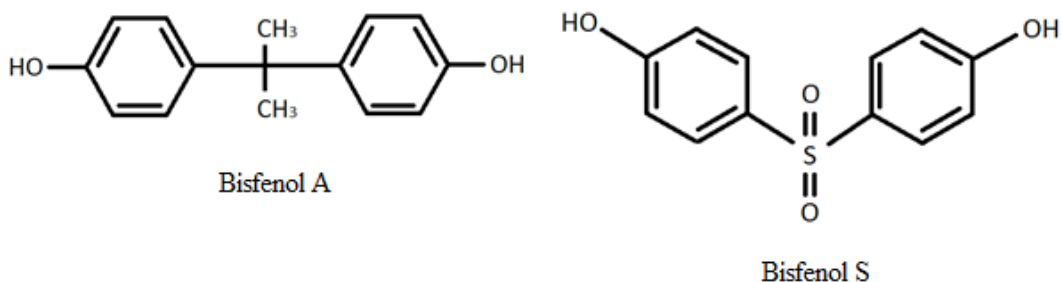
Současný výzkum endokrinních disruptorů prodělává prudký rozvoj a bylo zjištěno, že tyto látky ovlivňují i expresi miRNA (malé nekódující úseky RNA). Nejčastěji jsou vystavením endokrinnímu disruptoru narušeny epiteliální buňky, nicméně účinky těchto látek se mohou projevit také prostřednictvím narušení stromální části cílové tkáně. Stále ve fázi zkoumání je možnost, že by endokrinní disruptory mohly ovlivnit také biomechanické vlastnosti tkání, které jsou nezbytné pro epiteliální morfogenezi organismu. V neposlední řadě existují důkazy, že endokrinní disruptory dokáží v některých tkáních vyvolat i zánětlivou reakci (Sweeney et al., 2016). Mnoho výzkumů působení endokrinních disruptorů je prováděno na oocytech, jelikož kvalita oocyty, která determinuje životaschopnost z něj vzniklého embrya, je lehce narušitelná (Ferris et al., 2016).

Z výše uvedeného výčtu vyplývá, že endokrinní disruptory mají na organismus jak krátkodobý, tak dlouhodobý vliv. Variabilita působení těchto látek je navíc podpořena faktem, že je důležité, v jakém období života je organismus vystaven účinkům endokrinních disruptorů, neboť dokáží v různém stádiu vývoje působit na různé cílové tkáně (Sweeney et al., 2016). Možnost, že endokrinní disruptory vyskytující se v životním prostředí a v každodenním životě mohou ovlivňovat působení hormonů v těle a způsobovat tak různé potíže pozorované v lidské populaci i u volně žijících zvířat, způsobila znepokojení mezi autoritami s rozhodovacími pravomocemi a také mezi vědci (Beronius and Vandenberg, 2016). Výsledkem všeobecného znepokojení je množství studií poukazujících na škodlivost působení těchto látek a následné legislativní opatření k omezení jejich používání.

3.5.1 Bisfenoly - chemické složení a využití

V dnešní době patří mezi velmi zkoumané a diskutované endokrinní disruptory tzv. bisfenoly. Představují skupinu chemických sloučenin, které jsou složené ze dvou fenolových jader spojených dohromady nejčastěji prostřednictvím uhlíkového můstku případně pomocí jiné chemické struktury (Feng et al., 2016).

Obrázek 1: Bisfenoly



Zdroj: Rochester et Bolden, 2015

Bisfenoly se používají v kombinaci s jinými chemickými látkami při výrobě plastů a pryskyřic. Využívají se ve výrobě polykarbonátu, vysoce odolného, transparentního a pevného plastu. Z polykarbonátů se vyrábějí potravinové obaly, například vratné nápojové lahve, kojenecké lahve, plastové nádoby (talíře a hrnky) nebo skladovací boxy. Rezidua bisfenolů se mohou nacházet také v epoxidových pryskyřicích, používaných v ochranných foliích v potravinářství a v nápojových plechovkách (EFSA, 2016). Dále mohou být bisfenoly součástí lepidel, barev, dentálních tmelů či plastových vodovodních trubek (Ullah et al., 2016). Další rozšířené použití bisfenolů je v termálním papíru, který se hojně využívá v pokladnách jako účtenkový papír nebo v jiných termálních tiskárnách. Nebezpečí bisfenolů spočívá v tom, že malé množství této látky může migrovat z materiálu jej obsahující do potravin a nápojů a následně pak do lidského organismu, kde způsobuje různé problémy (EFSA, 2016).

3.5.2 Bisfenol A

Bisfenol A (bisphenol A - BPA) již má dlouhou historii. Tento monomer byl poprvé vyroben jako syntetický estrogen v 90. letech 19. století, ale až ve 30. letech století následujícího byly zkoumány jeho estrogenní vlastnosti v reprodukčním traktu samic potkana. Následně začal být BPA využíván chemickým průmyslem pro výrobu polymerů, jako antioxidant, inhibitor ukončení polymerace polyvinylchloridu a jako prekurzor pro syntézu látek zpomalujících hoření. Nicméně začal se používat také jako součást obalových materiálů, spotřebního zboží, lékařských přístrojů či dentálních materiálů. A jako jiné chemické látky může BPA na základě působení teploty a pH z těchto materiálů přestupovat do potravin, vzduchu, kůže, slin a krve. Bylo zjištěno, že přes 90 % expozice BPA pochází z potravin, kdežto přechod BPA

do organismu požitím prachu, dentálními zákroky nebo absorpcí přes pokožku zůstává za normálních podmínek pod 5 % (Acconcia et al., 2015).

BPA je masivně produkovanou celosvětově rozšířenou chemikálií. Jak již bylo řečeno, vykazuje estrogenní aktivitu a váže se na ER α i ER β . BPA může inhibovat aktivitu endogenních estrogenů a narušit fungování jaderných ERs. Stejně tak může ovlivnit organismus na negenomické úrovni a to navázáním na membránové receptory. Působí také na další části endokrinního systému, váže se na glukokortikoidní a androgenové receptory a celkově může komplexněji ovlivnit i centrální nervový systém a imunitní systém (Caserta et al., 2014). Další potenciální místo pro působení BPA jsou hormony štítné žlázy – potlačení transkripce receptorů pro thyroïdní hormony, dále může snižovat transport cholesterolu přes mitochondriální membrány, zvyšovat oxidaci mastných kyselin, stimulovat uvolňování prolaktinu a narušovat expresi aromatázy (Eichenlaub-Ritter and Pacchierotti, 2015). Výsledky nové studie na prasečích oocytech (Wang et al., 2016) ukazují další procesy narušené přítomností BPA. Při vystavení oocytů působení BPA se snížilo procento zrajících oocytů pravděpodobně díky zpomalenému buněčnému cyklu, expanze COCs byla nedostatečná, nedocházelo k vydělení pólového tělíska a oocyty se nedostaly do MII fáze. Dále ovlivňoval BPA cytoskeletární dynamiku. Oocyty kultivované s bisfenolem měly narušené dělicí vřeténko a ve fázi MI neměly oocyty seřazené chromozomy v ekvatoriální rovině. Vliv na špatnou tvorbu dělicího vřeténka měla nízká hladina jeho hlavního regulátoru MAPK. Byla narušena také distribuce aktinových filament. V oocytech byly narušeny také epigenetické procesy, jako jsou metylace histonů a DNA. Působení BPA vyvolávalo v oocytech zvýšení oxidativního stresu, vyšší hladiny reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen species – ROS), což mohlo vést k vyššímu procentu apoptózy oocytů v raných fázích vývoje.

Přestože potencionální efekt nízkých koncentrací BPA na reprodukci je stále předmětem výzkumů, mnohé studie naznačují, že BPA je pro oocyty škodlivý, snižuje jejich kvalitu jak u zvířecích modelů, tak u člověka (Eichenlaub-Ritter and Pacchierotti, 2015). Na základě studií o škodlivých účincích tohoto endokrinního disruptoru již některé země zakázaly používat BPA v obalových potravinových materiálech. Výrobci plastových obalů začali uvádět na trh „BPA free“ výrobky a vědecká společnost nadále upozorňuje na škodlivost BPA pro člověka a životní prostředí (Acconcia et al., 2015).

3.5.3 Substituent - bisfenol S

Jelikož vědci, regulační orgány i široká veřejnost vyjádřili obavy ohledně používání BPA, bylo zapotřebí vyhledat alternativní chemické látky. Nyní mezi užívané analogy bisfenolů patří mezi jinými bisfenol S (bisphenol S – BPS). Má široké využití například jako součást čisticích prostředků, jako galvanické rozpouštědlo nebo složka fenolových pryskyřic. Stejně jako BPA je obsažen v termálním papíru a to i v takovém s označením „BPA free“. BPS byl detekován v mnoha produktech každodenního užití, jako například v kosmetice (ve sprchových gelech, vlasových produktech, tělových krémech, zubních pastách a make-upu), v papírech (v bankovkách, letenkách, letácích, účtenkách nebo dopisových obálcích) nebo také v potravinách (v mléčných produktech, v mase a masných výrobcích, v zelenině, cereáliích nebo v konzervovaných potravinách). V menších koncentracích než BPA, ale přítomen byl BPS také v prachu, povrchové vodě a čističkách odpadních vod (Rochester et Bolden, 2015).

BPS je nyní široce využíván v produkci pryskyřic a plastických materiálů, protože je oproti bisfenolu A stabilnější za vysokých teplot a mnohem odolnější proti účinkům slunečního záření a biodegradaci (Kang et al., 2014). Bohužel před svým zavedením do výroby nebyl nijak zvlášť testován a nyní se začíná pracovat na studiích, které potvrzují, že obavy z působení BPS jako endokrinního disruptoru nebyly bezpředmětné. Některé tyto studie již byly publikovány, není jich však mnoho. Jednou z nich je studie (Vinas and Watson, 2013), která ukazuje, že BPS má stejný estrogení potenciál ve srovnání s BPA, což může způsobit narušení buněčné signalizace vyvolané estrogenem a následně k pozměněné buněčné proliferaci, smrti buňky a uvolnění prolaktinu. Výsledky studie (Ji et al., 2013) prováděné u dávná pruhovaného demonstrují, že BPS způsobuje reprodukční dysfunkci, změnu hladin reprodukčních hormonů a změnu transkripce genů osy hypotalamus-hypofýza-gonády. Další studie na dávná pruhovaném (Naderi et al., 2014) pozorovala vliv BPS, kdy byly bisfenolu vystaveny embrya a výsledkem bylo snížení růstové schopnosti, posun poměru pohlaví ve prospěch samiček a zvýšení hladin steroidních hormonů u obou pohlaví. Pozorovány byly také reprodukční nedostatky u dospělých jedinců, kdy se vyskytoval snížený počet oocytů a spermií a následně zygoty vykazovaly nižší schopnost hatchingu.

Ideálně by chemické látky používané jako substituenty jiných měly být zcela bezpečné, nebo alespoň mnohem méně škodlivé než původní chemikálie. Bohužel mnoho chemických substituentů se před uvedením na trh netestuje, někdy tak mohou vyvolávat stejné obavy jako

původní látky. Proto by měly být chemické analogy hodnoceny dříve, než se použijí jako náhrada. Jinak by se mohlo stát, že by substituent mohl být stejně nebo dokonce více škodlivý než původní chemikálie. Dříve již byla tato „politováníhodná náhrada“ použita u některých perfluorovaných látek, pesticidů a látek zpomalujících hoření (Rochester et Bolden, 2015).

4 Materiály a metodika

4.1 Izolace kumulo-oocytárních komplexů

Kumulo-oocytární komplexy (cumulus-oocyte complexes - COCs), ze kterých se získávaly oocyty pro následující experimenty, byly izolovány z vaječníků necyklujících prasnic 4 - 6 měsíců starých dovážených z jatek (Jatky Český Brod, A.s., Jatky Příbram). Až do příjezdu do laboratoře byly odebrané vaječníky udržovány při fyziologické teplotě 39°C. V laboratoři byly pak izolovány kumulo-oocytární komplexy z ovariálních folikulů o velikosti 2 – 5 mm za pomoci aspirační stříkačky (10 ml, BD Plastipak), ve které byl vytvořen podtlak, a injekční jehly o velikosti 18G (B. Braun Medical s.r.o.). Následně se folikulární tekutina přelila do nedělené Petriho misky a pod stereomikroskopem se pomocí skleněné pipety prováděl předvýběr vhodných COCs, které se pro konečnou selekci přemístily do manipulačního média TL-HEPES-PVA (složení viz Tabulka 1). Chemikálie pro přípravu médií byly použity od firmy Sigma-Aldrich s.r.o. Veškerá manipulace byla prováděna při fyziologické teplotě pro oocyty – 39°C v boxech vyhřívaných infra lampami. Pro experiment byly vybrány pouze plně dospělé oocyty ve stádiu GV s kompaktní vrstvou kumulárních buněk a celistvou cytoplazmou.

Tabulka 1: Složení manipulačního média TL-HEPES-PVA

	g/1000ml
NaCl	6,6633
KCl	0,2386
NaH₂PO₄	0,0408
Laktát sodný (L7900, S-A)	1,4 ml
MgCl₂.6H₂O	0,1017
HEPES	2,3830
Pyruvát sodný	0,0220
Sorbitol	2,1860
NaHCO₃	0,1680
CaCl₂.2H₂O	0,2940
Gentamicin (G1264, S-A)	0,0250
Penicilin G (PENK, S-A)	0,0650
PVA	0,1000
pH = 7,3 - 7,4	
Skladovat při 4°C	

4.2 Kultivace v podmínkách *in vitro*

Vybrané COCs byly kultivovány *in vitro* v modifikovaném kultivačním médiu M199 (Sigma, Life Science) s 5 % fetálního séra a gonadotropními hormony. Pro výrobu kultivačního média byl nejprve připraven zásobní roztok (složení viz Tabulka 2), který bylo možno skladovat v lednici max. týden a do něj byl v den kultivace přidán albumin, fetální bovinní sérum a gonadotropiny – P.G. 600 (MSD Animal Health, zástupce v ČR Intervet S.r.o.) Kultivace probíhala ve 4 důlkových kultivačních miskách (Thermo Scientific) umístěných v inkubátoru v podmínkách řízené atmosféry 39°C a 5 % CO₂ po dobu 48 hodin. V každém důlku byla vždy skupina vybraných COCs. Jedna skupina byla kontrolní a tři experimentální. V experimentálních skupinách byla do kultivačního media přidána zvolená koncentrace BPS rozpuštěného v DMSO (dimethylsulfoxid) – 3nM, 300nM a 30μM. Po skončení kultivace byly COCs pro následující analýzy zbaveny kumulárních buněk opakovaným pipetováním.

Tabulka 2: Složení zásobního média

	g/100ml
Laktát vápenatý	0,0600
Pyruvát sodný	0,0250
HEPES	0,1500
Gentamicin	0,0025
+ 1 lahvička (100 ml) média M199	

4.3 Imunocytochemie

Po ukončení kultivace a zbavení kumulárních buněk byly oocyty fixovány v 2% formaldehydu po dobu 40 minut při laboratorní teplotě. Pro účely experimentu byly oocyty rozděleny do pěti skupin. Z kontrolní skupiny oocytů byly vybrány nejméně 3 oocyty, které sloužily jako negativní kontrola. Následně byly oocyty dvakrát propláchnuty v roztoku PBS-NaN₃ (složení viz Tabulka 3) a poté permeabilizovány v roztoku 0,1% TritonuX-100 s PBS-NaN₃ po dobu opět 40 minut při laboratorní teplotě. Permeabilizace probíhala na dvanácti jamkové destičce (12 Well Chambre, Ibidi). Následovalo blokování oocytů po dobu 25 minut v 5% NGS (normal goat serum, normální kozí sérum), které bylo vyrobeno zředěním NGS (Sigma-Aldrich, s.r.o.) a roztoku 0,1% TritonuX-100 s PBS-NaN₃. Do této chvíle byly všechny skupiny oocytů zpracovávány stejným způsobem.

Tabulka 3: Složení PBS-NaN₃

	g/1000ml
NaCl	8,00
KCl	0,20
KH₂PO₄	0,26
Na₂HPO₄	1,10
NaN₃	0,50
pH = 7,2	

Dále již byly oocyty inkubovány s protilátkami. Nejprve byl připraven roztok primární protilátky ředěné v poměru 1:200 s 1% NGS, připraveným také s roztokem 0,1% TritonuX-100 s PBS-NaN₃. Pro tento experiment byla použita primární anti estrogen receptor alpha králičí (rabbit) protilátka (ab3575, Abcam). S touto protilátkou byly oocyty kultivovány po dobu 1 hodiny, a to v inkubátoru v podmínkách řízené atmosféry 39°C a 5 % CO₂. Pro kultivaci s protilátkou byly oocyty přesunuty na destičku s menšími jamkami (μ-Slide Angiogenesis, Ibidi). S primární protilátkou byly kultivovány všechny skupiny kromě negativní kontroly, která byla pouze v roztoku 1% NGS. Aby nebyl roztok s oocyty negativní kontroly kontaminován primární protilátkou, byla na tuto skupinu používána jiná skleněná pipeta. Následně byly oocyty dvakrát důkladně propláchnuty v roztoku 1% NGS, aby byly odstraněny nenavázané protilátky. Poté byl připraven roztok sekundární protilátky, která byla opět ředěna s 1% NGS a to v poměru 1:200. Jelikož jako primární byla použita králičí protilátka, jako sekundární musela být použita protilátka působící proti králičí (GAR 647 – goat anti-rabbit, ab150079, Alexa Fluor). V této protilátce již byly opět inkubovány všechny skupiny oocytů. Sekundární protilátka byla fluorescenčně značena (FITC – fluorescein isothiocyanate, zelená fluorescenční barva), a proto veškerá manipulace byla prováděna za nižší intenzity světla, a jakmile byly oocyty přesunuty do roztoku obsahující sekundární protilátku, následná inkubace probíhala za nepřístupu světla, po dobu 40 minut při laboratorní teplotě. Poté byly oocyty opět dvakrát důkladně propláchnuty v roztoku 1% NGS, aby byly odstraněny nenavázané protilátky.

Posledním krokem bylo namontování oocytů na sklíčko. Bylo použito podložní sklíčko s teflonovou vrstvou (Thermo Scientific). Na sklíčko byly vytvořeny kapky Vectashieldu s DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindolem, modrá fluorescenční barva, Life Technologies), do každé byla přenesena vždy jedna skupina oocytů, poté bylo přiloženo krycí sklíčko (24 x 60

mm, Marienfeld-Superior), jehož hrany byly následně potáhnuty vrstvou bezbarvého laku. Sklíčko pro analýzu tedy obsahovalo pět skupin oocytů – negativní kontrolu, kontrolu a oocyty kultivované se třemi různými koncentracemi BPS - 3nM, 300nM a 30μM.

4.4 Analýza obrazu

Snímky byly pořízeny s použitím invertovaného fluorescenčního Ti-U mikroskopu (Nikon), CCD kamery Clara Interline (Andor Technology PLC) a programu pro analýzu obrazu NIS Elements AR 4.0 (Nikon). Pro zjištění lokalizace zkoumaného proteinu byla po nasnímání vzorků odečtena negativní kontrola od pokusných oocytů a výsledný snímek pak ukazoval pouze zkoumaný protein – ER α . Princip metody spočíval v tom, že sekundární protilátka se vážala nejen na primární protilátku, ale také na sekvence podobné primární protilátce. Proto bylo v nasnímáném pokusu vidět detekovatelné pozadí. U negativní kontroly, která byla inkubována pouze se sekundární protilátkou, bylo vidět pouze nespecifické navázání sekundární protilátky. Proto, když byl od pokusu odečten tento nespecifický signál, výsledkem byla lokalizace pouze hledaného proteinu.

4.5 Statistická analýza

Data získaná z experimentu byla podrobena statistické analýze, kdy byla využita metoda analýzy rozptylu (ANOVA, t-test), která byla zpracována pomocí programu STATISTICA 12. Hladina významnosti pro určení statisticky významného rozdílu mezi porovnávanými skupinami oocytů byla stanovena ve výši 5 % ($P < 0,05$).

5 Výsledky

5.1 Vliv BPS na expresi a lokalizaci ER α při kultivaci 24 hodin

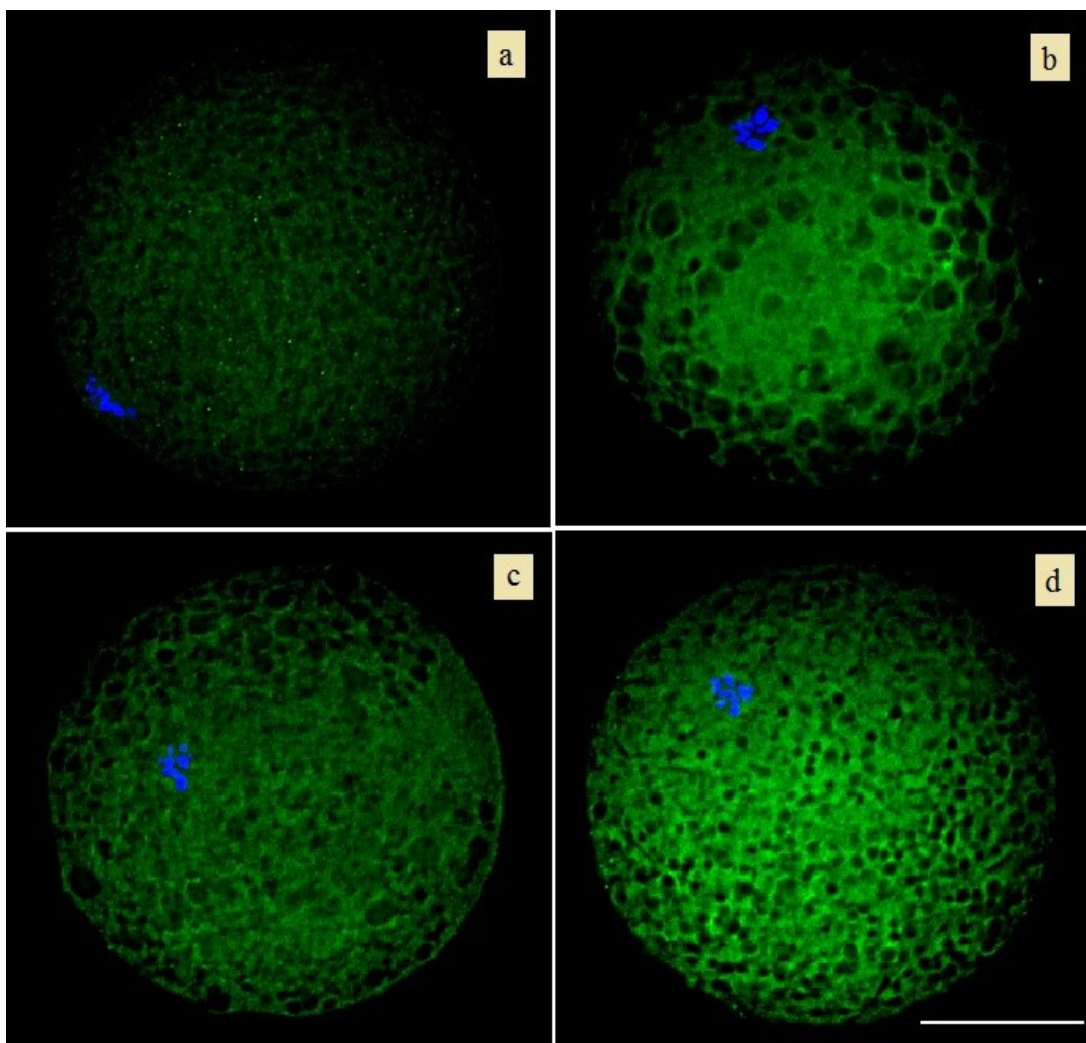
Cílem experimentu bylo posoudit vliv endokrinního disruptoru BPS na expresi a lokalizaci ER α . BPS byl v různých koncentracích přidáván do kultivačního média při *in vitro* kultivaci prasečích oocytů po dobu 24 hodin, do stádia MI. Testovány byly vždy čtyři skupiny oocytů (kontrolní skupina a tři skupiny oocytů ovlivněné různou koncentrací BPS - 3nM, 300nM a 30 μ M). Pro posouzení vlivu BPS na expresi a lokalizaci ER α během meiotického zrání prasečích oocytů byla provedena imunocytochemická analýza. Během experimentu byla použita specifická protilátka detekující přítomnost hledaných ERs. Pro odečtení nespecifického navázání protilátky byla testována také negativní skupina bez navázané specifické protilátky. Snímky z fluorescenčního mikroskopu byly následně podrobeny analýze obrazu. Přesná lokalizace ER α je znázorněna na reprezentativních snímcích kontrolní skupiny a experimentálních skupin – 3nM, 300nM a 30 μ M BPS (Obrázek 1), kde je možno porovnat expresi a lokalizaci s oocytem z kontrolní skupiny kultivovaným bez endokrinního disruptoru a také lze porovnat vliv BPS v různých koncentracích.

Fyziologická distribuce ER α v kontrolní skupině oocytů (Obrázek 1a) byla rovnoměrná, ER α byly rozloženy v celém objemu cytoplazmy a vytvářely téměř homogenní strukturu.

Značná změna lokalizace ER α byla zaznamenána u testované skupiny kultivované při 3nM BPS (Obrázek 1b). V centru oocytu vytvářely ER α jedolitou strukturu. Po obvodu membrány oocytu ovšem vytvářely pouze shluky, které oddělovaly místa bez receptorů.

Menší vliv než u předchozí koncentrace byl pozorován u skupiny kultivované v 300nM BPS (Obrázek 1c). Lokalizace ER α v centru oocytu byla homogenní a podél membrány se vytvářely menší a méně znatelné shluky.

Distribuce ER α byla nejpodobnější kontrolní skupině u oocytů kultivovaných v 30 μ M BPS (Obrázek 1d). ER α byly rozloženy v celém objemu cytoplazmy a jejich malé shluky vytvářely téměř homogenní strukturu. Vliv BPS zde byl znatelný spíše při porovnání exprese, která zde byla značně zvýšená.

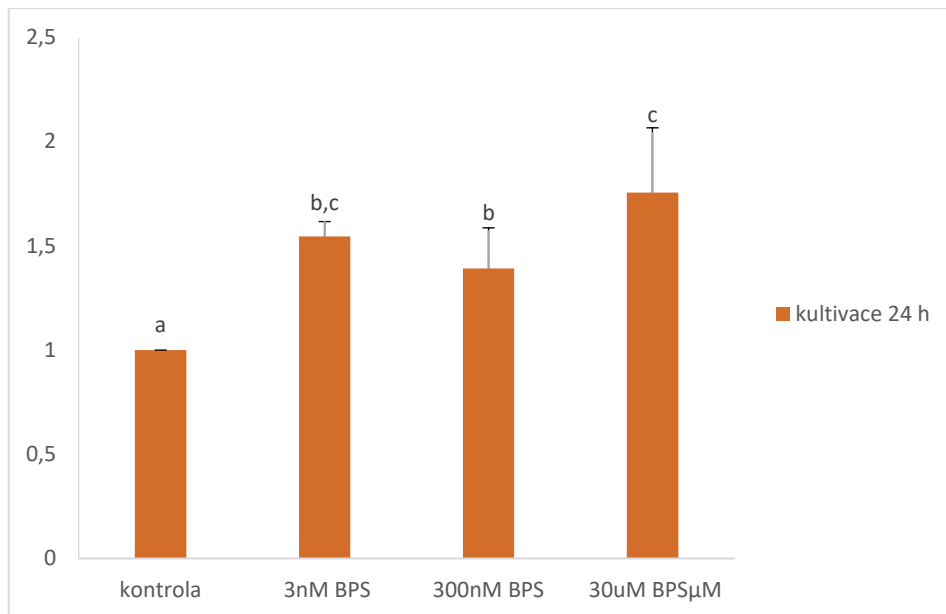


Obrázek 1: Imunocytochemická lokalizace ER α při kultivaci 24 hodin. Barvení - modře DAPI: chromatin, zeleně FITC: ER α . Zvětšení: 400x. Měřítko 50 μ m. ER α byly lokalizovány ve všech testovaných skupinách - 3nM (b), 300nM (c) a 30 μ M (d). Snímek z kontrolní skupiny oocytů (a) slouží k porovnání experimentální skupiny s kontrolou kultivovanou bez BPS.

5.1.1 Relativní intenzita fluorescence ER α při kultivaci 24 hodin

Posouzením intenzity fluorescence lze porovnat působení BPS na jednotlivé experimentální skupiny. Intenzita fluorescence je hodnota, která zde udává míru exprese hledaného proteinu. Podle míry fluorescence nelze sice určit lokalizaci proteinu, nicméně je to vhodný prostředek, jak matematicky vyjádřit vliv BPS na jednotlivé skupiny oocytů a zároveň je mezi sebou porovnat. Pro přehledné znázornění výsledků experimentu je zde uveden statisticky zpracovaný graf (Graf 1), ze kterého je možno vyčíst, jak působil endokrinní disruptor BPS na expresi ER α u prasečích oocytů.

Při *in vitro* kultivaci oocytů po dobu 24 hodin s různými koncentracemi BPS (vyhodnocení viz Graf 1) nejvýraznější intenzitu fluorescence vykazovala skupina kultivovaná s 30 μ M BPS, která se statisticky lišila od kontrolní skupiny oocytů i od skupiny kultivované v 300nM BPS, ale nelišila se od skupiny kultivované v 3nM BPS. Zrovna tato skupina dosahovala druhé nejvyšší intenzity fluorescence. Statisticky se lišila pouze od kontrolní skupiny oocytů, odlišnost od ostatních testovaných skupin nebyla statisticky průkazná. Nejmenší vliv BPS při kultivaci 24 hodin byl zjištěn u koncentrace 300nM BPS. Tato skupina se významně lišila od kontrolní skupiny a také od skupiny kultivované v 30 μ M BPS, nicméně nevykazovala statisticky významný rozdíl v porovnání s oocyty kultivovanými v 3nM BPS. V porovnání s oocyty kultivovanými po dobu 48 hodin byly výsledky uvnitř jednotlivých skupin tohoto experimentu více rozkolísané. Směrodatné odchylky u skupin kultivovaných v 300nM a 30 μ M BPS nabývaly vyšších hodnot.



Graf 1: Relativní intenzita fluorescence ERα po *in vitro* kultivaci 24 hodin. Na ose x zobrazuje graf čtyři skupiny oocytů (kontrolu a tři různé koncentrace BPS, ve kterých byly oocyty kultivovány - 3nM, 300nM a 30μM), osa y znázorňuje relativní intenzitu fluorescence, kdy jako základní hodnota byla brána intenzita fluorescence kontrolní skupiny (ohodnoceno hodnotou 1), a ostatní experimentální skupiny byly vztaženy k této hodnotě. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatní odchylka, pocházejí z minimálně tří na sobě nezávislých experimentů a v každé skupině bylo analyzováno nejméně 20 oocytů. Odlišné superskripty ^{a,b,c} vyjadřují statisticky významný rozdíl mezi studovanými skupinami na hladině významnosti 5 % ($P < 0,05$).

5.2 Vliv BPS na expresi a lokalizaci ER α při kultivaci 48 hodin

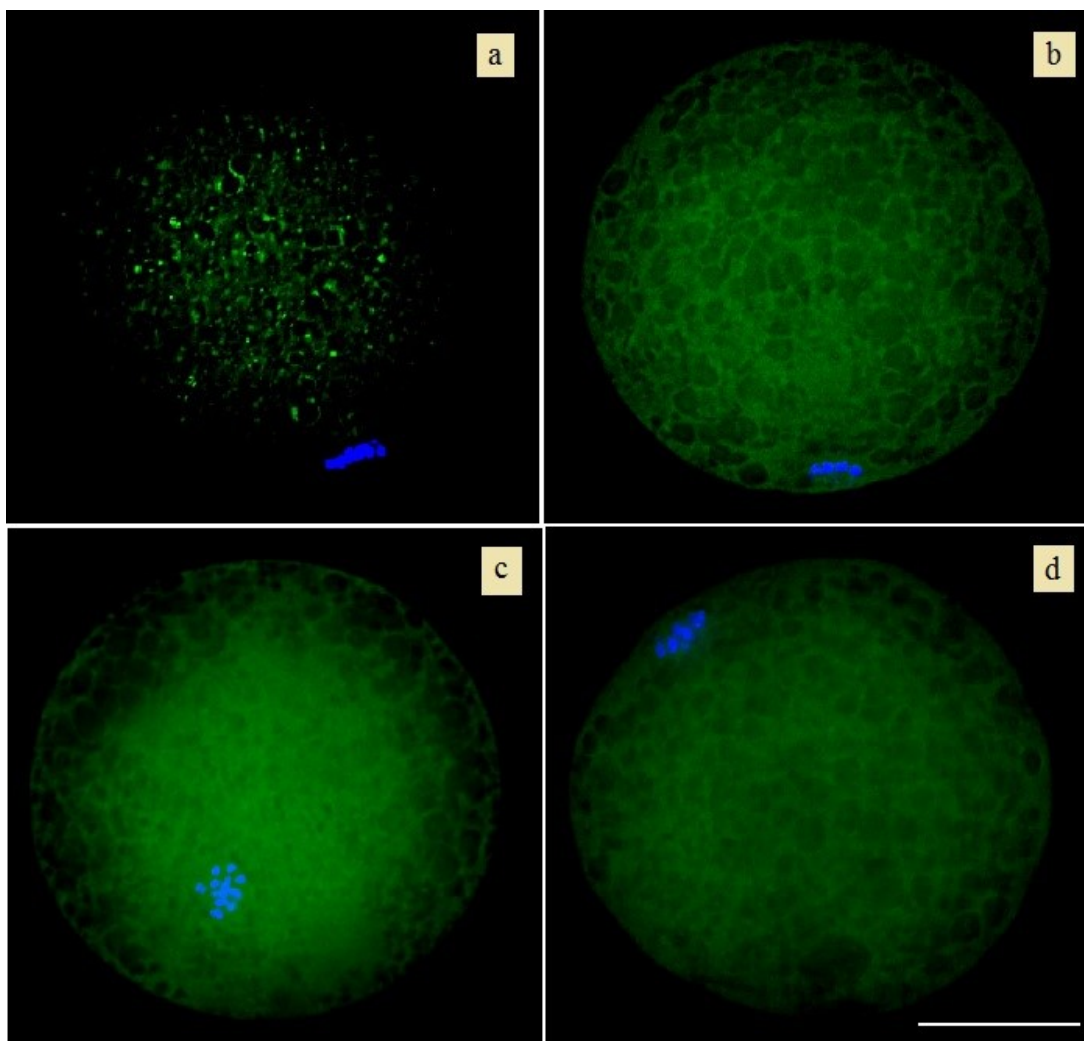
Cílem experimentu bylo posoudit vliv endokrinního disruptoru BPS na expresi a lokalizaci ER α . BPS byl v různých koncentracích přidáván do kultivačního média při *in vitro* kultivaci prasečích oocytů po dobu 48 hodin, do stádia MII. Přesná lokalizace ER α je znázorněna na reprezentativních snímcích kontrolní skupiny a experimentálních skupin – 3nM, 300nM a 30 μ M BPS (Obrázek 2), kde je možno porovnat expresi a lokalizaci s oocyttem z kontrolní skupiny kultivovaným bez endokrinního disruptoru a také lze porovnat vliv BPS v různých koncentracích. Experiment byl prováděn a hodnocen stejným způsobem jako u skupiny oocytů kultivované 24 hodin.

ER α u kontrolní skupiny oocytů kultivovaných bez BPS (Obrázek 2a) vytvářely ve středu oocytu množství shluků. Kolem membrány oocytu se jich vyskytovalo jen minimální množství.

Při nejnižší testované koncentraci BPS – 3nM (Obrázek 2b) se lokalizace významně lišila od kontrolní skupiny oocytů. ER α vytvářely menší či větší shluky a byly lokalizovány v celém objemu cytoplazmy i podél membrány oocytu.

U druhé testované skupiny oocytů kultivované při koncentraci BPS 300nM (Obrázek 2c) byla patrná největší změna v porovnání s ostatními skupinami. Přestože byly ER α lokalizovány spíše v centru, méně podél membrány oocytu jako u kontrolní skupiny, jejich exprese byla zvýšená. Receptory vytvářely v centru oocytu homogenní strukturu, kdežto po obvodu vytvářely spíše jednotlivé shluky.

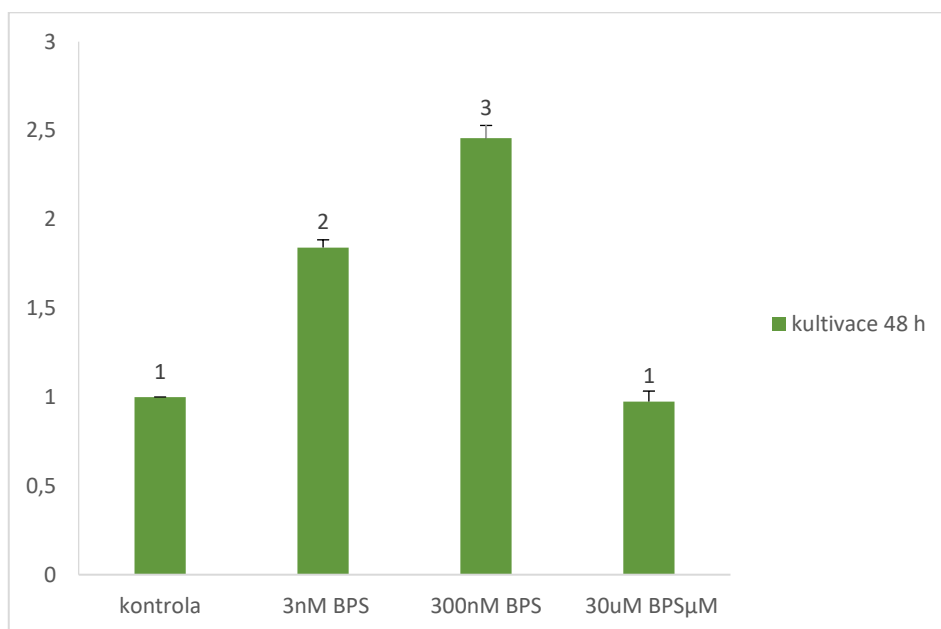
U testované skupiny kultivované v médiu s nejvyšší koncentrací BPS - 30 μ M (Obrázek 2d) byla změna nejméně zřetelná. ER α byly lokalizovány v celém objemu cytoplazmy i podél membrány oocytu a vytvářely menší či větší shluky. Podobný vliv měla na oocyty i koncentrace 3nM BPS, nicméně zde u vyšší koncentrace byla exprese nižší.



Obrázek 2: Imunocytochemická lokalizace ER α při kultivaci 48 hodin. Barvení - modře DAPI: chromatin, zeleně FITC: ER α . Zvětšení: 400x. Měřítko 50 μ m. ER α byly lokalizovány ve všech testovaných skupinách - 3nM (b), 300nM (c) a 30 μ M (d). Snímek z kontrolní skupiny oocytů (a) slouží k porovnání experimentální skupiny s kontrolou kultivovanou bez BPS.

5.2.1 Relativní intenzita fluorescence ER α při kultivaci 48 hodin

Při *in vitro* kultivaci oocytů po dobu 48 hodin s různými koncentracemi BPS (vyhodnocení viz Graf 2) vykazovala nejvyšší hodnotu fluorescence experimentální skupina kultivovaná v médiu s 300nM BPS. Se statisticky významným rozdílem se tato skupina lišila od všech ostatních. Následně skupina s 3nM BPS udávala druhou nejvyšší intenzitu fluorescence a také se statisticky lišila od ostatních. Jedinou testovanou skupinou, která se statisticky nelišila od kontrolní skupiny, byly oocyty kultivované v 30 μ M BPS, což ukázalo, že vliv BPS v této koncentraci je nejmenší. Testované skupiny oocytů byly ve výsledcích konzistentní, jejich směrodatné odchylky v rámci skupiny byly minimální.



Graf 2: Relativní intenzita fluorescence ER α po *in vitro* kultivaci 48 hodin. Na ose x zobrazuje graf čtyři skupiny oocytů (kontrolu a tři různé koncentrace BPS, ve kterých byly oocyty kultivovány - 3nM, 300nM a 30 μ M), osa y znázorňuje relativní intenzitu fluorescence, kdy jako základní hodnota byla brána intenzita fluorescence kontrolní skupiny (ohodnoceno hodnotou 1), a ostatní experimentální skupiny byly vztaženy k této hodnotě. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatní odchylka, pocházejí z minimálně tří na sobě nezávislých experimentů a v každé skupině bylo analyzováno nejméně 20 oocytů. Odlišné superskripty ^{1,2,3} vyjadřují statisticky významný rozdíl mezi studovanými skupinami na hladině významnosti 5 % (P<0,05).

6 Diskuze

Meióza je složitý komplex procesů, jehož řízení závisí na mnoha regulujících faktorech. Jedním z nich může být 17β -estradiol (E2). Je to nejdůležitější estrogen, který hluboce ovlivňuje růst, diferenciaci a funkce mnoha tkání (související s reprodukční soustavou, ale také jiných). Aby mohl správně fungovat, musí se navázat na jaderný estrogenový receptor (ER α a ER β), který následně funguje jako ligandem aktivovaný transkripční faktor a reguluje transkripci genů ovlivňovaných estrogeny (estrogen response element – ERE). Přestože je zrající oocyt transkripčně inaktivní, ERs jsou nepostradatelné v dalším vývoji při nástupu transkripce u embrya (La Rosa et al., 2014). Estradiol přidáný ke kultivačnímu médiu příznivě ovlivnil meiotickou a vývojovou kompetenci prasečích oocytů, zlepšil soudržnost kumulárních buněk kolem oocytu, aby pokrývaly celý povrch oocytu, a také podpořil expanzi kumulo-oocytárního komplexu (Kubo et al., 2015).

ERs jsou součástí rodiny jaderných receptorů, které jsou charakteristické interakcí s hormony. Působí jako transkripční faktory a specificky regulují expresi cílových genů, které se podílejí na fungování metabolismu, vývoje a reprodukce. Tyto receptory jsou pro buňky důležité, jelikož zpracovávají intra a extracelulární signály pro regulaci exprese genů (Li et al., 2015).

Endogenní hormony, jako jsou například progestiny, estrogény, androgeny, glukokortikoidy, vitamin D3, thyroïdní a retinoidní hormony, aktivují normální funkci jaderných receptorů. Nicméně endokrinní disruptory nacházející se ve vnějším okolí dokáží také interagovat s jadernými receptory a mohou takto způsobovat poruchy. Jelikož jaderné receptory regulují expresi mnoha genů, některé z nich jsou spojeny s nemocemi jako je rakovina, osteoporóza či obezita, mohou mít endogenní chemické látky narušující fungování jaderných receptorů hluboký vliv na organismus (Sonoda et al., 2008).

BPS je chemická látka nyní nově implementována v průmyslové výrobě plastů a dalších materiálů. V roce 2011 zakázala Evropská Komise využívat BPA ve výrobě kojeneckých lahví. Tato regulace přispěla k výrobnímu využití jeho analogu, BPS (Grignard et al., 2012). Jelikož BPS je látka na trhu poměrně nová, regulacím zatím nepodléhá. Bezpečnost BPS jako náhražky doposud nebyla popsána a studií zabývajících se působením BPS v organismu je pouze omezené množství. Jelikož je BPS strukturním analogem BPA a vykazuje také slabou

estrogenní aktivitu (Grignard et al., 2012), je pravděpodobné, že jeho účinky na organismus budou srovnatelné s BPA. Bylo prokázáno, že prasečí oocyty jsou velmi citlivé na působení BPA při *in vitro* zrání (Wang et al., 2016) a jelikož prasečí oocyty se v mnohém podobají lidským, mohou být výsledky studií zkoumající vliv jak BPA, tak i BPS na prasečích oocytech aplikovány také v oblasti lidské reprodukce.

Estradiol je zodpovědný za regulaci buněčné proliferace, a protože BPA vykazuje estrogenní aktivitu, může tuto regulaci narušit. Regulace je zprostředkována díky rovnováze mezi signály vysílanými ER α a ER β . ER α vysílají signály k indukci proliferace buněk (např. u buněk mléčné žlázy při laktaci), kdežto signály zprostředkované ER β inhibují buněčnou proliferaci (např. u buněk mléčné žlázy po ovulaci nebo laktaci). Estradiol udržuje rovnováhu mezi těmito receptory, snižuje celkový počet ER α a zvyšuje hladiny ER β . BPA působí v přítomnosti ER α jako agonista a podporuje proliferaci, kdežto v přítomnosti ER β působí jako naprostý antagonist. Při vystavení buňky účinkům BPA se může stát, že buňka bude podporována signály z ER α k proliferaci a bez správných signálů z ER β může dojít až k započetí rakovinného bujení (Acconcia, 2015). Afinita BPA k ERs je sice mnohem nižší než u estradiolu, nicméně BPA může ovlivňovat organismus také jinou cestou a to díky aktivaci membránových ERs. Ty působí na negenomické úrovni a transkripční aktivitu vyvolávají pomocí působení sekundárních buněčných posílů (Quesada et al., 2002).

ERs se vyskytují nejen v oocytech, ale také v celých kumulo-oocytárních komplexech (Wu et al., 1992) před začátkem, ale také po fázi zrání. Koncentrace ERs uvnitř oocyty jsou před a po zrání relativně na stejné hladině, nicméně během meiotického zrání se koncentrace mění. Největší nárůst ERs byl pozorován po kultivaci 24 hodin, poté koncentrace klesla, kdy po 42 hodinách kultivace byla přibližně na třetinové hodnotě (Dode and Graves, 2003). Jedna studie (Xu et al., 2009) se věnovala pouze určitému typu ER α v myších oocytech a potvrdila, že se vyskytovaly v oocyty ve všech stádiích vývoje. Bez ohledu na fázi folikulogeneze byly tyto receptory lokalizovány až do GVBD v jadérku oocyty. Další studie prováděná na myších (Jefferson et al., 2002) prokázala výskyt ER α i ER β na myších vaječnicích ve všech stádiích vývoje, kdy po celou dobu převažovaly ER β a s věkem se jejich hladiny zvyšovaly, kdežto výskyt ER α s věkem myši klesal.

Účelem této práce bylo zhodnotit vliv BPS na meiotické zrání prasečích oocytů, a to prostřednictvím vlivu na ER α . BPS patří mezi endokrinní disruptory, heterogenní chemické

látky, které jsou známé svou schopností vázat se na ER α a tím ovlivňovat estrogeny kontrolované aspekty tělesné homeostáze, což zahrnuje také rovnováhu mezi buněčnou proliferací a apoptózou (La Rosa et al., 2014). Jelikož studie zabývající se vlivem BPS na savčí oocyty ještě nejsou k dispozici, je možno vycházet ze studií zabývajících se vlivem BPA na oocyty, ale také na somatické buňky, nebo lze nahlédnout do studií zkoumající vliv jiného endokrinního disruptoru působící na ERs.

Studie prováděná na myších oocytech (Chao et al., 2012) potvrdila zvýšenou expresi ERs během růstu a zrání oocytu při společné kultivaci s BPA. Exprese byla zvýšená na úrovni mRNA i proteinu. Ze studie vyplynulo, že při vystavení myši účinkům BPA, může tento endokrinní disruptor potlačit metylaci imprintovaných genů, a to prostřednictvím ovlivnění exprese ERs.

Dříve zmíněná studie (Jefferson et al., 2002) zkoumala vliv jiné chemické látky s estrogením účinkem, a to fytoestrogenu genisteinu obsaženého v sójových bobech, na vyvíjející se vaječníky myší. Studie ukázala, že genistein ovlivňuje expresi ER α , která byla po vystavení kontaminantu zvýšena.

Negativní účinky BPS na meiotické zrání prasečích oocytů, které byly popsány v této práci, mohou být výstražné také z toho důvodu, že koncentrace BPS, které byly použity v experimentech, byly mnohem nižší než koncentrace naměřené ve vzorcích moči a krevního séra u lidí (Thayer et al., 2016). V této práci byl popsán negativní účinek i tak malé koncentrace BPS jako je 3nM, což nebylo pozorováno u dřívějších experimentů zkoumající vliv BPA na zrání savčích oocytů.

Výsledky této práce prokázaly, že BPS ovlivňuje působení estrogenů a to změnou exprese a lokalizace ERs. Estradiol je důležitý hormon, který se mimo jiné podílí na jaderném zrání během meiózy, kde ovlivňuje tvorbu dělicího vřeténka. Zvýšená koncentrace estradiolu během zrání oocytu vede k poruchám tvorby dělicího vřeténka, což může způsobit špatné uspořádání chromozomů v metafázi a následné poruchy embryonálního vývoje (Beker-van Woudenberg, 2004). Z toho vyplývá, že BPS může prostřednictvím ovlivnění působení estradiolu narušovat tvorbu meiotického dělicího vřeténka a tím i průběh samotné meiózy. Což nasvědčuje také studie zkoumající vliv BPA na *in vitro* zrání prasečích oocytů (Wang et al., 2016), která potvrdila negativní efekt BPA na progresi buněčného cyklu, tvorbu dělicího vřeténka a organizaci chromozomů.

Chemické látky ze životního prostředí, které vykazují estrogenní aktivitu, jsou podezřívány z podílení se na zvýšení výskytu poruch reprodukce u člověka, jako je například snížení reprodukční schopnosti u mužů, nebo zvýšení výskytu rakoviny prsu u žen (Washington et al., 2001). Jelikož tyto látky fungují v organismu prostřednictvím navázání na proteiny, jako jsou ER α nebo ER β , je důležité, aby výzkumu těchto endokrinních disruptorů a jejich interakci s ERs byla věnována dostatečná pozornost.

7 Závěr

Cílem této práce bylo potvrdit hypotézu, že BPS negativně ovlivňuje průběh meiotického zrání prasečích oocytů prostřednictvím změn v expresi a lokalizaci ER α . Hypotéza byla ověřována pomocí imunocytochemické detekce proteinů – ER α v prasečích oocytech kultivovaných 24 a 48 hodin v přítomnosti různých koncentrací BPS.

Experimenty ukázaly, že BPS ovlivňuje lokalizaci ER α v prasečích oocytech, a tím přispívá k narušení jejich meiotického zrání. Každá koncentrace BPS v závislosti na délce kultivace ovlivňovala lokalizaci ERs jinak, buď vytvářením shluků, nebo naopak silně homogenních struktur, kde byly zaznamenány odlišnosti v porovnání s kontrolními skupinami.

Na úrovni exprese proteinu ER α byly rovněž zaznamenány změny. Pomocí změření relativní intenzity fluorescence u testovaných skupin oocytů bylo potvrzeno, že exprese ER α po vystavení účinkům BPS se zvyšuje. Při kultivaci 24 hodin byla nejvyšší intenzita fluorescence naměřena u oocytů kultivovaných v 30 μ M BPS, kdežto při delší kultivaci 48 hodin nejvyšší intenzitu vykazovala skupina kultivovaná v 300nM BPS.

Doposud byl dopad BPS na samičí reprodukci studován pouze u nižších organismů (Chen et al., 2016) a ryb (Ji et al., 2013; Naderi et al., 2014). V této práci je poprvé popsán vliv BPS na vývoj oocytu savců a jeho působení na ERs. Změny, které byly detekovány, mohou vést ke vzniku poškozených zárodečných buněk, závažným chybám v průběhu meiotického zrání oocytů a mohou dokonce vést i k neplodnosti. Pro pochopení celkových důsledků vlivu BPS na organismus jsou proto nutné další experimenty zabývající se detailním vysvětlením účinku BPS.

8 Seznam použité literatury a pramenů

Odborná literatura

Acconcia, F., Pallottini, V., Marino, M. 2015. Molecular Mechanisms of Action of BPA. Dose-response. 13 (4).

Adhikari, D., Liu, K. 2013. Regulation of Quiescence and Activation of Oocyte Growth in Primordial Follicles. In: Coticchio, G., Albertini, D. F., De Santis, L. (eds.). Oogenesis. Springer. London. p. 49-62. ISBN: 9780857298256.

Albertini, D. F. 2015. The Mammalian Oocyte. In: Plant, T. M., Zeleznik, A. J. (eds.). Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 4th Edition. Academic Press. San Diego. p. 59-97. ISBN: 9780123971753.

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2005. Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky. Espero Publishing. Ústí nad Labem. 740 s. ISBN: 8090290620.

Assidi, M., Sirard, M.-A. 2013. Cumulus Cell Gene Expression as a Marker of Oocyte Quality. In: Coticchio, G., Albertini, D. F., De Santis, L. (eds.). Oogenesis. Springer. London. p. 231-252. ISBN: 9780857298256.

Beker-van Woudenberg, A. R., van Tol, H. T. A., Roelen, B. A. J., Colenbrander, B., Bevers, M. M. 2004. Estradiol and Its Membrane-Impermeable Conjugate (Estradiol-Bovine Serum Albumin) During In Vitro Maturation of Bovine Oocytes: Effects on Nuclear and Cytoplasmic Maturation, Cytoskeleton, and Embryo Quality. Biology of Reproduction. 70 (5). 1465-1474.

Beronius, A., Vandenberg, L. N. 2016. Using systematic reviews for hazard and risk assessment of endocrine disrupting chemicals. Reviews in endocrine and metabolic disorders. 16 (4). 273-287.

Bielańska-Osuchowska, Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. Reproductive Biology. 6 (2). 161 – 193.

- Binder, A. K., Winuthayanon, W., Hewitt, S. C., Couse, J. F., Korach, K. S. 2015. Steroid Receptors in the Uterus and Ovary. In: Plant, T. M., Zeleznik, A. J. (eds.). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 4th Edition. Academic Press. San Diego. p. 1099-1193. ISBN: 9780123971753.
- Caserta, D., Di Segni, N., Mallozzi, M., Giovanale, V., Mantovani, A., Marci, R., Moscarini, M. 2014. Bisphenol a and the female reproductive tract: an overview of recent laboratory evidence and epidemiological studies. *Reproductive biology and endocrinology*. 12.
- Cohen, P. E., Holloway, J. K. 2015. Mammalian Meiosis. In: Plant, T. M., Zeleznik, A. J. (eds.). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 4th Edition. Academic Press. San Diego. p. 5-57. ISBN: 9780123971753.
- De Felici, M. 2013. Origin, Migration, and Proliferation of Human Primordial Germ Cells. In: Coticchio, G., Albertini, D. F., De Santis, L. (eds.). *Oogenesis*. Springer. London. p. 19-37. ISBN: 9780857298256.
- Dechat, T., Adam, S. A., Taimen, P., Shimi, T., Goldman, R. D. 2010. Nuclear lamins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2 (11). a000547.
- Dode, M. A. N., Graves, C. N. 2003. Role of estradiol-17 beta on nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Animal Reproduction Science*. 78 (1-2). 99-110.
- Eichenlaub-Ritter, U., Pacchierotti, F. 2015. Bisphenol A effects on mammalian oogenesis and epigenetic integrity of oocytes: a case-study exploring risks of endocrine disrupting chemicals. *Biomed research international*.
- Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal reproduction science*. 78 (3-4). 203-206.
- Feng, Y. X., Jiao, Z. H., Shi, J. C., Li, M., Guo, Q. Z., Shao, B. 2016. Effects of bisphenol analogues on steroidogenic gene expression and hormone synthesis in H295R cells. *Chemosphere*. 147. 9-19.

- Ferris, J., Mahboubi, K., MacLusky, N., King, W. A., Favetta, L. A. 2016. BPA exposure during *in vitro* oocyte maturation results in dose-dependent alterations to embryo development rates, apoptosis rate, sex ratio and gene expression. *Reproductive toxicology*. 59. 128-138.
- Fulka, J., First, N. L., Moor, R. M. 1998. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Molecular Human Reproduction*. 4 (1). 41-49.
- Gilbert, S. F. 2000. *Developmental Biology*. 6th ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts. p. 695. ISBN: 0878932436.
- Greathouse, K. L., Walker, C. L. 2010. Mechanisms of endocrine disruption. In: Woodruff, T. J., Janssen, S. J., Guillette, L. J., Giudice, L. C. (eds.). *Environmental Impacts on Reproductive Health and Fertility*. Cambridge University Press. United Kingdom. p. 72-91. ISBN: 0521519527.
- Grignard, E., Lapenna, S., Bremer, S. 2012. Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S. *Toxicology in Vitro*. 26 (5). 727-731.
- Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reproduction*. 5 (2). 122-130.
- Chao, H. H., Zhang, X. F., Chen, B., Pan, B., Zhang, L. J., Li, L., Sun, X. F., Shi, Q. H., Shen, W. 2012. Bisphenol A exposure modifies methylation of imprinted genes in mouse oocytes via the estrogen receptor signaling pathway. *Histochemistry and Cell Biology*. 137 (2). 249-259.
- Chen, Y. C., Shu L., Qiu, Z. Q., Lee, D. Y., Settle, S. J., Hee, S. Q., Telesca, D., Yang, X., Allard, P. 2016. Exposure to the BPA-Substitute Bisphenol S Causes Unique Alterations of Germline Function. *Plos Genetics*. 12 (7). e1006223.
- Jefferson, W. N., Couse, J. F., Padilla-Banks, E., Korach, K. S., Newbold, R. R. 2002. 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. *Biology of Reproduction*. 67 (4). 1285-1296.

- Ji, K., Hong, S., Kho, Y., Choi, K. 2013. Effects of Bisphenol S Exposure on Endocrine Functions and Reproduction of Zebrafish. *Environmental Science & Technology*. 47 (15). 8793-8800.
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., Tilly, J. L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428 (6979). 145-150.
- Jones, K. T. 2008. Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Human reproduction update*. 14 (2). 143-158.
- Jones, K. T., Lane, S. I. R., Holt, J. E. 2013. Start and Stop Signals of Oocyte Meiotic Maturation. In: Coticchio, G., Albertini, D. F., De Santis, L. (eds.). *Oogenesis*. Springer. London. p. 183-193. ISBN: 9780857298256.
- Kang, J. S., Choi, J. S., Kim, W. K., Lee, Y. J., Park, J. W. 2014. Estrogenic potency of bisphenol S, polyethersulfone and their metabolites generated by the rat liver S9 fractions on a MVLN cell using a luciferase reporter gene assay. *Reproductive biology and endocrinology*. 12.
- Kim, J., Kim, J. S., Jeon, Y. J., Kim, D. W., Yang, T. H., Soh, Y., Lee, H. K., Choi, N. J., Park, S. B., Seo, K. S. 2011. Identification of maturation and protein synthesis related proteins from porcine oocytes during *in vitro* maturation. *Proteome science*. 9(1), 1.
- Kim, J. Y. 2012. Control of ovarian primordial follicle activation. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 39 (1). 10-14.
- Kubo, N., Cayo-Colca, I. S., Miyano, T. 2015. Effect of estradiol-17 β during *in vitro* growth culture on the growth, maturation, cumulus expansion and development of porcine oocytes from early antral follicles. *Animal Science Journal*. 86 (3). 251-259.
- La Rosa, P., Pellegrini, M., Totta, P., Acconcia, F., Marino, M. 2014. Xenoestrogens Alter Estrogen Receptor (ER) alpha Intracellular Levels. *Plos One*. 9 (2). e88961.
- Li, L. L., Wang, Q. Q., Zhang, Y., Niu, Y. Z., Yao, X. J., Liu, H. X. 2015. The Molecular Mechanism of Bisphenol A (BPA) as an Endocrine Disruptor by Interacting with Nuclear Receptors: Insights from Molecular Dynamics (MD) Simulations. *Plos One*. 10 (3). e0120330.

- Liu, K., Rajareddy, S., Liu, L., Jagarlamudi, K., Boman, K., Selstam, G., Reddy, P. 2006. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: New roles for an old timer. *Developmental Biology*. 299 (1). 1-11.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, Ch. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L., Darnell, J. 2003. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman. New York. p. 973. ISBN: 0716743663.
- McGee, E. A., Hsueh, A. J. W. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Review*. 21 (2). 200-214.
- Mehlmann, L. M. 2013. Signaling for Meiotic Resumption in Granulosa Cells, Cumulus Cells, and Oocyte. In: Coticchio, G., Albertini, D. F., De Santis, L. (eds.). *Oogenesis*. Springer. London. p. 171-182. ISBN: 9780857298256.
- Miyano, T., Lee, J., Fulka, J. 2003. G2/M transition of pig oocytes: How do oocytes initiate maturation? *Reproductive Medicine and Biology*. 2 (3). 91-99.
- Mlynarčíková, A., Nagyová, E., Ficková, M., sesuková, S. 2009. Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes. *Toxicology in vitro*. 23 (3). 371-377.
- Motlík, J., Fulka, J. 1976. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Zoology*. 198 (2). 155-162.
- Motlík, J., Kubelka, M. 1990. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 27 (4). 366-375.
- Myers, M., Hutt, K. J. 2013. Damage Control in the Female Germline: Protecting Primordial Follicles. In: Coticchio, G., Albertini, D. F., De Santis, L. (eds.). *Oogenesis*. Springer. London. p. 39-47. ISBN: 9780857298256.
- Naderi, M., Wong, M. Y. L., Gholami, F. 2014. Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquatic Toxicology*. 148. 195-203.

- Pavelka, M., Roth, J. 2010. Functional Ultrastructure. Springer. Vienna. p. 366. ISBN: 978-3-211-99389-7.
- Picton, H. M., Harris, S. E., Muruvi, W., Chambers, E. L. 2008. The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction*. 136. 703-715.
- Qi, R., Xu, N., Wang, G., Ren, H., Li, S., Lei, J., Lin, Q. Y., Wang, L. H., Gu, X., Zhang, H. Y., Jiang, Q., Zhang, C. M. 2015. The lamin-A/C-LAP2 alpha-BAF1 protein complex regulates mitotic spindle assembly and positioning. *Journal of cell science*. 128 (15). 2830-2841.
- Quesada, I., Fuentes, E., Viso-Leon, M. C., Soria, B., Ripoll, C., Nadal, A. 2002. Low doses of the endocrine disruptor bisphenol-A and the native hormone 17beta-estradiol rapidly activate transcription factor CREB. *Faseb Journal*. 16 (10). 1671.
- Richards, J. S., Liu, Z., Shimada, M. 2015. Ovulation. In: Plant, T. M., Zeleznik, A. J. (eds.). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 4th Edition. Academic Press. San Diego. p. 997-1021. ISBN: 9780123971753.
- Rochester, J. R., Bolden, A. L. 2015. Bisphenol S a F: A systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol a substitutes. *Environmental health perspectives*. 123 (7). 643-650.
- Sathananthan, A. H., Selvaraj, K., Girijashankar, M. L., Ganesh, V., Selvaraj, P., Trounson, A. O. 2006. From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microscopy Research and Technique*. 69 (6). 396-407.
- Sonoda, J., Pei, L. M., Evans, R. M. 2008. Nuclear Receptors: Decoding Metabolic Disease. *Febs Letters*. 582 (1). 2-9.
- Sun, Y. C., Cheng, S. F., Sun, R., Zhao, Y., Shen, W. 2014. Reconstitution of Gametogenesis *in Vitro*: Meiosis Is the Biggest Obstacle. *Journal of Genetics and Genomics*. 41 (3). 87-95.
- Sweeney, M. F., Hasan, N., Soto, A. M., Sonnenschein, C. 2016. Environmental endocrine disruptors: Effects on the human male reproductive system. *Reviews in endocrine and metabolic disorders*. 16 (4). 341-357.

- Thayer, K. A., Taylor, K. W., Garantziotis, S., Schurman, S. H., Kissling, G. E., Hunt, D., Herbert, B., Church, R., Jankowich, R., Churchwell, M. I., Scheri, R. C., Birnbaum, L. S., Bucher, J. R. 2016. Bisphenol A, Bisphenol S, and 4-Hydroxyphenyl 4-Isopropoxyphenylsulfone (BPSIP) in Urine and Blood of Cashiers. *Environmental Health Perspectives*. 12 (4). 437-444.
- Trounson, A., Gosden, R., Eichenlaub-Ritter, U. 2013. *Biology and pathology of the oocyte: Role in Fertility, medicine and nuclear reprogramming*. Cambridge University Press. New York. 464s. ISBN: 1107021901.
- Ullah, H., Jahan, S., Ul Ain, Q., Shaheen, G., Ahsan, N. 2016. Effects of bisphenol S exposure on male reproductive system of rats: A histological and biochemical study. *Chemosphere*. 152. 383-391.
- Verlhac, M.-H., Breuer, M. 2013. Cytoskeletal Correlates of Oocyte Meiotic Divisions. In: Coticchio, G., Albertini, D. F., De Santis, L. (eds.). *Oogenesis*. Springer. London. p. 195-207. ISBN: 9780857298256.
- Vinas, R., Watson, C. S. 2013. Bisphenol S Disrupts Estradiol-Induced Nongenomic Signaling in a Rat Pituitary Cell Line: Effects on Cell Functions. *Environmental Health Perspectives*. 121 (3). 352-358.
- Wang, T., Han, J., Duan, X., Xiong, B., Cui, X. S., Kim, N. H., Liu, H. L., Sun, S. C. 2016. The toxic effects and possible mechanisms of Bisphenol A on oocyte maturation of porcine *in vitro*. *Oncotarget*. 7 (22). 32554-32565.
- Washington, W., Hubert, L., Jones, D., Gray W. G. 2001. Bisphenol a binds to the low-affinity estrogen binding site. *In Vitro & Molecular Toxicology – A Journal of Basic and Applied Research*. 14 (1). 43-51.
- Wu, T. C. J., Wang, L., Wan, Y. J. Y. 1992. Expression of estrogen receptor gene in mouse oocyte and during embryogenesis. *Molecular Reproduction and Development*. 33 (4). 407-412.
- Xu, B. Z., Lin, S. L., Li, M., Zhu, J. Q., Li, S., Ouyang, Y. C., Chen, D. Y., Sun, Q. Y. 2009. Changes in estrogen receptor- α variant (ER- α 36) expression during mouse ovary development and oocyte meiotic maturation. *Histochemistry and Cell Biology*. 131 (3). 347-354.

Yuan, Y., Krisher, R. L. 2012. In vitro maturation (IVM) of porcine oocytes. Germline development: Methods and protocols, Methods in molecular biology. 825. 183-198.

Internetové zdroje

EFSA. Bisphenol A. European Food Safety Authority [online]. 2016. [cit. 2016-12-29]. Dostupné z <<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol>>.