

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Vliv bisfenolu S na průběh meiotického zrání prasečích
oocytů**

Diplomová práce

Autor práce: Petra Baudišová

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 průběh meiotického zrání prasečích oocytů" jsem vypracoval(a) 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 autor(ka) uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. dubna 2017

Poděkování

Rád(a) bych touto cestou poděkoval(a) Ing. Tereze Žalmanové, Ph.D., Ing. Kristýně Hoškové, Ph.D. a Ing. Šárce Prokešové za odborné vedení, velkou trpělivost, vstřícný přístup a cenné rady při vypracování této diplomové práce. Také chci poděkovat své rodině a příteli za ohleduplnost a podporu během celého studia.

Vliv bisfenolu S na průběh meiotického zrání prasečích oocytů

Souhrn

Meiotické zrání oocytů je zásadním dějem v rámci oogeneze, a proto je přesně regulováno řadou složitých buněčných mechanismů. Samotné zrání je zajištěno dosažením meiotické kompetence oocytu, tedy nabytím jeho schopnosti úspěšně dokončit zrání a fertilizaci za vzniku kvalitní blastocysty, schopné uskutečnit vývoj životaschopného, zdravého potomstva. Během zrání oocytu dochází k redistribuci a kvalitativním i kvantitativním změnám organel, oocyty ztrácí závislost na folikulárním prostředí. Obecně je oocyt považován za zralý, má-li vydělené první pólové tělísko a jeho vývoj je pozastaven v metafázi meiózy II.

Endokrinní disruptory jsou exogenní látky, které mohou zasahovat do tělního endokrinního systému a způsobovat nepříznivé vývojové, reprodukční a homeostatické procesy u lidí i zvířat. Jde o látky syntetické i přírodní, které se vyskytují v množství produktů lidské denní potřeby. Významným cílem jejich působení je reprodukční soustava, neboť její funkce je na správné hormonální signalizaci závislá. Jedním z velmi diskutovaných endokrinních disruptorů je bisfenol A. Poté, co mnoho studií prokázalo jeho nepříznivé efekty na lidský organismus, se z důvodu nátlaku vědců i veřejnosti přistoupilo k omezení jeho použití. Dochází tak k jeho nahrazování strukturním analogem, bisfenolem S (BPS), u něž negativní efekty na lidské zdraví zatím prokázány nebyly.

Na základě dostupných informací byla stanovena hypotéza, že bisfenol S negativně ovlivňuje průběh meiotického zrání prasečích oocytů. Cílem práce bylo ověření této hypotézy. K ověření hypotézy byl použit bisfenol S ve 3 koncentracích, a to 3 nM, 300 nM a 30 μ M.

Výsledek experimentu naznačuje, že meiotické zrání prasečích oocytů je působením bisfenolu S významně negativně ovlivněno. Závažnost efektů je závislá na použité koncentraci BPS. Po 24 hodinách kultivace prasečích oocytů bylo pod vlivem BPS statisticky průkazně zvýšené množství oocytů, které nezačaly meiotické zrání a nedosáhly první meiotické metafáze. Také při 48hodinové kultivaci oocytů docházelo pod vlivem BPS k významnému snížení množství oocytů, které byly schopny dosáhnout metafáze II.

Klíčová slova: prase, oocyt, bisfenol S, disruptor, meiotické zrání

Effects of bisphenol S on meiotic maturation of porcine oocytes

Summary

Oocyte maturation is a crucial process within oogenesis and therefore it is subject of significant regulation. Oocyte maturation itself is ensured by reaching meiotic competence, which means the ability of oocyte to successfully complete the maturation and fertilization and to produce quality blastocyst capable of realizing development of viable, healthy offspring. During oocyte maturation, redistribution and qualitative and quantitative changes of organelles occur. Oocytes lose dependence on follicular environment. It is generally considered a mature oocyte, if it divided the first pole body and its development is suspended in metaphase of meiosis II.

Endocrine disruptors are exogenous substances that can interfere with the body's endocrine system and cause adverse developmental, reproductive and homeostatic effects of humans and animals. These substances can be of synthetic or natural origin and take place in many products of human daily needs. Reproductive system is an important target of their action, because it is essentially controlled by the endocrine system. One of the most discussed endocrine disruptors is bisphenol A. Because of many studies that have shown its adverse effects on the human health, scientists and the public reached restriction of its use. That leads to its replacement by structural analog, bisphenol S (BPS), whose adverse effects on human health have not been proven yet.

Based on available information, hypothesis was stated that BPS adversely affects the process of meiotic maturation of porcine oocytes. The aim was to test this hypothesis. To verify this hypothesis, bisphenol S was used at 3 concentrations, 3 nM, 300 nM and 30 μ M.

Results of this experiment indicate that the meiotic maturation of porcine oocytes is significantly adversely affected after bisphenol S treatment. Severity of its effects depends on the concentration of BPS used. When cultured with BPS for 24 hours, there was significant increase in number of oocytes that had not initiated meiotic maturation and have not reached the first meiotic metaphase. Also, after 48 hours of cultivation with BPS, there was significant reduction in number of oocytes that have been able to reach metaphase II.

Keywords: pig, oocyte, bisphenol S, disruptor, meiotic maturation

Obsah

| | |
|---|-----------|
| 1 Úvod..... | 1 |
| 2 Vědecká hypotéza a cíle práce | 2 |
| 3 Přehled literatury | 3 |
| 3.1 Oogeneze..... | 3 |
| 3.1.1 Fáze množení | 4 |
| 3.1.2 Fáze růstu | 5 |
| 3.1.3 Fáze zrání | 7 |
| 3.2 Regulace oogeneze..... | 10 |
| 3.2.1 Vstup do meiózy I..... | 10 |
| 3.2.2 Regulace prvního meiotického bloku | 10 |
| 3.2.3 Regulace druhého meiotického bloku..... | 13 |
| 3.3 Folikulogeneze | 14 |
| 3.3.1 Primordiální folikul..... | 14 |
| 3.3.2 Primární folikul..... | 15 |
| 3.3.3 Sekundární folikul..... | 15 |
| 3.3.4 Terciární folikul | 15 |
| 3.4 Regulace folikulogeneze | 16 |
| 3.5 Endokrinní disruptory | 19 |
| 3.5.1 Bisfenoly | 21 |
| 3.5.1.1 Bisfenol A (BPA) | 21 |
| 3.5.1.2 Bisfenol S | 24 |
| 4 Materiál a metody | 26 |
| 5 Výsledky..... | 29 |
| 5.1 Efekt BPS na meiotické zrání při 24hodinové kultivaci <i>in vitro</i> | 29 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.2 | Efekt BPS na meiotické zrání při 48hodinové kultivaci <i>in vitro</i> | 31 |
| 6 | Diskuze | 33 |
| 7 | Závěr..... | 37 |
| 8 | Seznam literatury | 38 |

1 Úvod

Meitoické zrání oocyty je složitě regulovaný buněčný proces. Na úspěšném průběhu vývoje oocyty závisí pozdější životaschopnost a kvalita embryí.

Endokrinní disruptory jsou látky z vnějšího prostředí, které mohou zasahovat do tělního endokrinního systému a způsobovat nepříznivé efekty u lidí i zvířat. Jako takové mohou mít vliv také na narušení meiotického zrání oocytů. To se může projevat jako zpomalení nebo úplné zastavení buněčného cyklu či jako vývoj chromozomálně abnormálních oocytů.

Bisfenol S je strukturním analogem bisfenolu A, endokrinního disruptoru, zodpovědného za značné množství reprodukčních poruch. V důsledku toho je za něj hledána náhrada pro použití v průmyslové výrobě. Efekty nejčastější náhrady, bisfenolu S, jsou velice málo prozkoumány. V poslední době však vychází najevo, že nejde o neškodnou náhradu. Proč, to se pokusím nastínit v mé diplomové práci.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Na základě dostupných informací byla stanovena hypotéza, že bisfenol S negativně ovlivňuje průběh meiotického zrání prasečích oocytů.

Pro ověření této hypotézy byly stanoveny dílčí cíle:

- Zhodnotit vliv bisfenolu S na průběh meiotického zrání a to ve stádiích první a druhé meiotické metafáze.
- Pomocí sledování změn v průběhu meiotického buněčného cyklu zmapovat vliv bisfenolu S jako endokrinního disruptoru na meiotické zrání oocytů prasete.

3 Přehled literatury

3.1 Oogeneze

Oogeneze je vývoj oocyty z prekurzorových buněk, oogonií, ve zralé, oplozenischopné oocyty. Začíná velmi brzy, již během prenatalního vývoje jedince. U druhů, které za svůj život produkují tisíce oocytů, jsou oogonie tvořeny kmenovými buňkami, které přetrvávají aktivní po celý život organismu. Avšak u druhů, mezi které patří také většina savců a jež produkují méně oocytů, se oogonie opakovaně mitoticky dělí, dokud nevytvoří omezené množství prekurzorových buněk oocytů (Gilbert, 2000). Tento úsek oogeneze je nazýván fází množení.

Mnoho oogonií zaniká již během prenatalního vývoje organismu, ostatní však vstupují do meiózy. Od té doby jsou nazývány primárními oocyty, a procházejí profází meiózy I až do diplotenní fáze. Tehdy je jejich vývoj zastaven přinejmenším do nástupu puberty a oocyty podstupují fázi růstu. S nástupem puberty dochází periodicky u skupin primárních oocytů k obnovení meiózy. Většina jich však i v období po narození zaniká (Gilbert, 2000).

V dalším vývoji dochází ke zrání oocyty. Jaderná membrána primárního oocyty se rozpadá, metafázní vřeteno migruje k periferii buňky. V telofázi I je vyděleno první pólóvé tělíčko, které, ač jde o dceřinnou buňku, neobsahuje téměř žádnou cytoplazmu. Od vydělení pólóvého tělíčka je oocyt nazýván sekundárním oocytem. Zrání oocyty je ukončeno pozastavením meiózy v metafázi II (Gilbert, 2000).

Gamety vzniklé oogenezí obsahují veškerý potřebný materiál k zahájení a udržení jejich metabolismu a vývoje. V jejich cytoplazmě se akumulují energetické zdroje a organely, tvořící energii (žloutek a mitochondrie), dále enzymy a prekurzory DNA, RNA a proteosyntézy, mRNA, strukturní proteiny a regulační faktory pro kontrolu časné embryogeneze (Gilbert, 2000).

Nejvýraznějšími organelami v prasečím oocyty jsou vedle jádra vácčky vázané na membránu, lipidové kapky a mitochondrie. Membránové vácčky zde tvoří více než 15 % objemu buňky a zčásti obklopují endoplazmatické retikulum (ER). Lipidové kapky zaujímají 20 % objemu prasečího oocyty. Struktura a rozměry těchto kapek se odvíjí od stadia zrání oocyty a také se častěji vyskytují poblíž ER. ER je v buňce místem vzniku a dalšího transportu proteinů, lipidové kapky a velké vácčky proto díky tomuto úzkému vztahu zřejmě obsahují také fosfoproteiny. Mitochondrie obsahují několik krist a často se vyskytují poblíž vezikulárního nebo cisternového ER. Golgiho aparát se nachází na periferii oocyty nebo vedle

jádra. Ribozomy jsou přítomny bez preferencí jak volně ve formě růžic, tak na hrubém ER (Cran, 1985).

Centrálním dogmatem reprodukční biologie donedávna bylo, že savčí oocyty, vzniklé prenatalně, tvoří konečnou zásobu oocytů pro celý reprodukční život samice. Naprostá většina oocytů přitom podléhá atrezii (Tilly, 2001). Podle Bukovského et al. (2005) mohou vznikat savčí primordiální zárodečné buňky z buněk somatických. Mitoticky aktivní zárodečné kmenové buňky se vyskytují u dospělých samic poloopic (Duke, 1967; David et al., 1974). Nově jsou pozorovány také u dospělých samic myši. Jejich zdrojem by mohly být buňky kostní dřeně (Johnson et al., 2005). U žen může docházet k mezenchymálně-epiteliální tranzici mezenchymálních buněk ovariální *tunica albuginea* v povrchové epiteliální buňky vaječnicků. Ty mohou dále diferencovat v primitivní granulózní a zárodečné buňky (Bukovsky et al., 2005).

3.1.1 Fáze množení

Oocyty vznikají vývojem z primordiálních zárodečných buněk (PGC). Diferenciace a vývoj PGC se u savců odehrává v ranném embryonálním vývoji. Jejich prekurzory jsou prvně lokalizovány v epiblastu embrya před gastrulací, kde na ně působí specifické signály, vylučované sousedními buňkami. Ty předurčují některé buňky k vývoji v PGC (Irie et al., 2014). Během ranné gastrulace migrují PGC do vyvíjejícího se embrya, kde osídlí základy gonád, v té době pohlavní lišty (Coticchio et al., 2013). Díky panožkám se přibližně 18. den po oplodnění začínají améboidním pohybem přesouvat z dorzální části zadního střeva do pohlavní lišty plodu, kam prvně dospějí 23. den vývoje (Takagi et al., 1997). Během tohoto přesunu dochází k jejich proliferaci a jaderné reprogramaci, při které se aktivují geny pro pluripotenci a epigeneticky se upraví jejich genom (Coticchio et al., 2013).

Jakmile se porcinní zárodečné buňky dostanou do gonád, množí se mitózou a nazývají se oogoniemi. Nejvyšší mitotická aktivita je pozorována 28 dní po oplození a mizí 52. den vývoje. Oogonie jsou relativně velké buňky s kulovitým jádrem. To obvykle obsahuje jedno nebo dvě velká jádérka, často s několika menšími mikrojadérky (Ioannou, 1964).

Po druhově specifickém množství cyklů mitotického dělení vstupuje většina oogonií do profáze meiózy I. Od toho okamžiku jsou tyto buňky nazývány primárními oocyty (Ioannou, 1964; Fair, 2003).

3.1.2 Fáze růstu

Vstup oocytů do meiotického dělení není úzce synchronizován, přesto 35 dní po oplození převládají na vaječnicích plodů březích prasnic oocyty ve fázi leptotene, 40. den vývoje dominují oocyty v zygotenní fázi profáze meiózy I a 50. den jsou na vaječnicích nejčetnější oocyty v pachytenním stadiu. Již v průběhu tohoto vývoje se buňka zvětšuje. Fáze diplotene se poprvé objevuje přibližně 35 dní po oplození (Ioannou, 1964). 35 dní po porodu jsou všechny oogonie na vaječnicích prasničky v profázi prvního meiotického dělení (Hunter, 2000).

V profázi meiózy I postupně dochází ke zvyšování kondenzace chromatinu. V zygotene se párují homologní chromozomy, tvoří se synaptonemální komplexy (homologické chromozomy se pevně spojují za pomoci zvláštní proteinové struktury). Kondenzace chromatinu pokračuje také v pachytene, zdvojené chromozomy se kondenzují do stále menšího objemu. Během pachytene může docházet ke crossing-overu a tedy výměně genetického materiálu mezi spárovanými chromozomy. V diplotene se již od sebe chromozomy částečně oodělují, ale stále zůstávají v těsném kontaktu v místech, kde došlo k překřížení chromatid (Snustad et Simmons, 2009).

V diplotene profáze I také dochází k prvnímu pozastavení buněčného cyklu (tzv. první meiotický blok). Jádru oocytu je v té době ve stadiu zárodečného váčku (Coticchio et al., 2013).



Obrázek 1: Orceinem barvený heterochromatin, uspořádaný kolem jádérka prasečího oocytu ve stádiu zárodečného váčku. Převzato a upraveno dle Miyano et al., 2003.

Během tohoto meiotického bloku oocyty rostou, jsou transkripčně aktivní a jejich jádra obsahují alespoň jedno aktivní jádérko. Jadérka těchto oocytů jsou tvořena fibrilo-granulární sítí, která je prokládaná fibrilárními centry a malými vakuolami. Během

fáze růstu se prasečí oocyty zvětšují z velikosti 30 μm na velikost 120 μm (Motlik et Fulka, 1986). Poté, co dosáhnou plné velikosti, jejich transkripční aktivita významně klesá a dochází ke změně konformace chromatinu, z relativně rozptýleného na více kondenzované uspořádání (Fulka et al., 1998; Mahrous et al., 2012). Během růstové fáze je velmi důležitá akumulace zásob mRNA, ribozomů a polypeptidů v oocytu z důvodu zdárného proběhnutí dalšího vývoje (Fair, 2003).

Oocyty také akumulují obrovské množství mitochondriální DNA. Nedostatečné množství mitochondriální DNA/mitochondrií může vést k snížené kvalitě oocytů až k infertilitě. Mitochondriální DNA se průběžně akumuluje během růstu oocytu, obsah mtDNA se přestává zvyšovat v momentě, kdy oocyt dosáhne plné velikosti. (Mahrous et al., 2012). Pro plně dorostlé oocyty je charakteristická akumulace aktivních mitochondrií na periferii oocytu a v okolí zárodečného váčku (Sun et al., 2001). Většina mitochondrií, a to 3x více než ve zbytku oocytu, je soustředěna na periferii buňky (Cran, 1985).

Na povrchu oocytu se tvoří *zona pellucida* (ZP), což je unikátní vysoce uspořádaná extracelulární struktura, tvořená glykoproteiny. Glykoproteiny ZP jsou velmi pravděpodobně syntetizovány oocytem a/nebo kumulárními buňkami. Jednotlivé vrstvy ZP se tvoří v časové posloupnosti, přičemž nejspodnější vrstva se tvoří jako poslední. Tvorba matrix ZP zahrnuje regulovaný proteolytický proces, zprostředkovaný členy rodiny furinových konvertáz. ZP myších oocytů je tvořena 3 glykoproteiny, a to ZP1, ZP2 a ZP3. ZP2 a ZP3 tvoří heterodimery, které jsou zde uspořádány ve formě vláken, přes které se ukládají homodimery ZP1. Tento model je přijímán i u ostatních vyšších obratlovců, u myši je nejdokonaleji prostudován. ZP1 tak slouží jako spojovací molekula, stabilizační element. ZP2 je sekundární receptor pro navázání akrozomálně reagující spermie. ZP3 slouží jako primární receptor pro navázání intaktní spermie a navození akrozomální reakce (Familiari et al., 2008). U prasete obsahuje ZP kromě 3 zmíněných glykoproteinů ještě čtvrtý, a to ZP4 (Rath et al., 2006), stejně jako např. u člověka, šimpanze, makaka a potkana. Hypotetický model struktury takovéto *zona pellucida* počítá s podobnou vláknitou strukturou ZP2/ZP3 heterodimerů jako podklad pro spojovací molekuly ZP1 homodimerů, ZP4 homodimerů a ZP1/ZP4 heterodimerů (Familiari et al., 2008). Tloušťka *zona pellucida* prasečích oocytů je asi 10 μm (Dunbar et al., 1980). Strukturní proteiny vnitřní vrstvy ZP jsou hustěji sbalené než proteiny vnější části ZP, a to z důvodu možnosti roztažení vnější části matrix ZP, což je nezbytné v reakci na růst oocytu/embrya, který se ve velikosti až 300krát zvětší (Familiari et al., 2008).

3.1.3 Fáze zrání

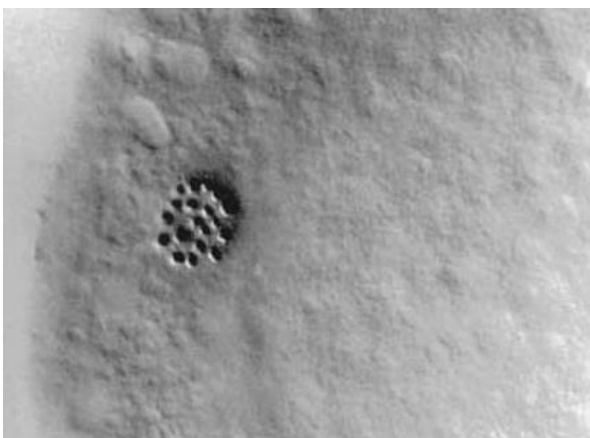
Ke zrání oocyty dochází *in vivo* v důsledku vlny luteinizačního hormonu (LH), předcházející ovulaci. Avšak ještě před proběhnutím LH vlny nastává tzv. pre-maturace oocyty. Jakmile je ustanoven dominantní folikul, dochází u jeho oocyty k některým ultrastrukturálním změnám, jako je zvýšení obsahu lipidů v cytoplazmě, snížení velikosti golgiho komplexu a přesunutí kortikálních granul k povrchu oocyty. Během dalšího vývoje a maturace dominantního folikulu dochází k dalšímu zmenšování golgiho komplexu, jaderná membrána se zvlí, jádro se vakuolizuje a uspořádá do prstencové struktury. Zvětšuje se velikost perivitellinního prostoru (Assey et al., 1994).

Za samotnou maturaci (zrání) oocytů je pak považováno období mezi dvěma meiotickými bloky v profázi I a metafázi II. Podmínkou pro zahájení zrání je dosažení takzvané meiotické kompetence. Plná meiotická kompetence oocyty znamená jeho schopnost úspěšně dokončit zrání a fertilizaci za vzniku kvalitní blastocysty, schopné zajistit vývoj životaschopného, zdravého potomstva. Při částečné meiotické kompetenci jsou oocytů schopny vývoje pouze do metafáze I (Coticchio et al., 2013).

Meiotická kompetence se dá hodnotit z několika hledisek, přičemž žádné by nemělo být zanedbáno. Jednak jde o morfologickou kompetenci, tedy morfologické parametry kvalitního oocyty. Důležitá je jaderná kompetence, neboli schopnost primárního oocyty podstoupit rozpad zárodečného váčku a dokončit meiózu (Coticchio et al., 2013). Na rozpadu zárodečného váčku je často závislá aktivace aspektů cytoplazmatického zrání (Eppig, 1996). Cytoplazmatická kompetence zahrnuje ultrastrukturální změny cytoplazmy oocyty, které umožní úspěšnou fertilizaci, dělení embrya a ranný embryonální vývoj (Coticchio et al., 2013). Nízká vývojová kompetence je např. spojována s nedostatečnou sítí mikrotubulů v cytoplazmě oocyty, což mj. narušuje správnou relokalizaci mitochondrií (Brevini et al., 2005). Molekulární kompetence pak zahrnuje molekulární procesy, probíhající v jádře i cytoplazmě oocyty během fáze zrání, tedy především dostatečnou akumulaci proteinů a RNA (Coticchio et al., 2013). Rostoucí prasečí oocytů o průměru menším, než 90 μm , nejsou *in vitro* schopné obnovení meiózy (Hirao et al., 1994; Sun et Nagai, 2003).

Obnovení buněčného cyklu je *in vivo* závislé na specifických signálech, většinou hormonech, *in vitro* pak závisí na uvolnění oocytů z folikulárního prostředí (Pincus et Enzmann, 1935). Vytváří se dělicí vřetenko, mikrotubuly se připojují na kinetochory chromozomů. Ty se v metafázi I (MI) pohybují směrem k ekvatoriální rovině, která je kolmá na osu dělicího vřeten. Dochází k postupnému oddělování spárovaných

chromozomů (chromozomová disjunkce), které je zajištěno zkracováním mikrotubulů dělicího vřeténka. Rozdělené chromozomy putují k opačným pólům buňky a definitivně se od sebe oddělují v anafázi I. V telofázi I se dělicí vřeténko rozpadá, dceřinná buňka se oddělí svou plazmatickou membránou. V profázi II vzniká nové dělicí vřeténko. V metafázi II se kondenzované chromozomy přesouvají do ekvatoriální roviny. Jejich centromery se začínají oddělovat (Snustad et Simmons, 2009). Zásadní vliv na průběh meiózy má regulace aktivity MAPK (mitogenem aktivované proteinkinázy). Inaktivace MAPK narušuje separaci chromozomů, vydělení pólového tělíska a tvorbu dělicího vřetena (Lee et al., 2000).

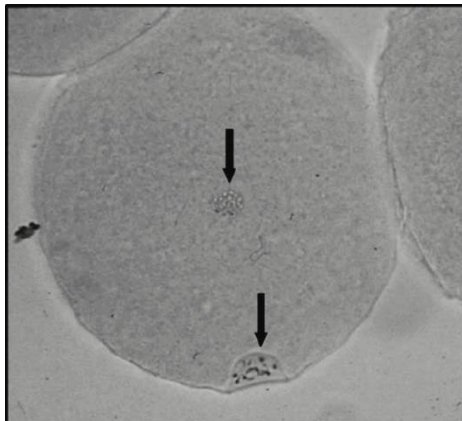


Obrázek 2: Chromozomy seřazené v tzv. metafázní destičce metafáze I v prasečím oocytu, obarveném orceinem. Převzato a upraveno dle Miyano et al., 2003.

Prasečí oocyty v preovulačních folikulech dokončují první meiotické dělení přibližně 36-40 hodin po LH vlně, ještě před ovulací, a neprodleně vstupují do meiózy II (Hunter, 2000). Dochází k vydělení prvního pólového tělíska. Jde o nerovnoměrné rozdělení buňky, způsobené kortikální migrací dělicího vřeténka, závislé na aktinových mikrofilamentech a na forminu 2 (aktin vázající protein). Když se vřeteno přiblíží k oolemě, v oblasti nad ním se akumuluje aktin, myozin, protein Par6 a malé GTPázy Rho, Rac a Cdc42 (Cell division control protein 42), které určují polaritu v množství buněčných systémů. Vzniká kortikální aktinová čepička, která je spojena s pólovým vřetenem poblíž plazmatické membrány a s ním spojenou sadou rozdělených homologů (chromozomů) a je následně oddělena od zbytku oocytu konstrikcí myozinového prstence. Účelem tohoto nerovnoměrného rozdělení buňky je udržení RNA a proteinů uvnitř oocytu. Ty jsou využitelné v metafázi meiózy II a pro raný embryonální vývoj. Dalším důvodem je vznik co nejmenší buňky, s kterou by mohla namísto oocytu případně při oplození fúzovat spermie (Jones, 2008). V metafázi II je buněčný cyklus opět pozastaven, tento meiotický blok přetrvává, dokud není vajíčko aktivováno fúzí se spermií. (Hunter, 2000; Adhikari et al., 2015).

Po obnovení meiózy I dochází kromě jaderného zrání také ke změnám počtu mitochondrií, lipidových kapek a velkých váčků v cytoplazmě oocyty. Spolu s těmito změnami dochází k redistribuci a kvalitativním změnám organel. Objemová frakce mitochondrií zůstává během zrání oocyty konstantní (asi 6 %). Dochází však ke snížení počtu mitochondrií. Mitochondrie tedy nabývají na velikosti, přímá měření ukázala zvětšení velikosti mitochondrií až o více než 300 %. Dochází k poklesu množství mitochondrií na periférii, eventuálně k zvýšení jejich počtu ve zbytku buňky. Shlukování mitochondrií u plazmatické membrány je běžné a může jít o výhodnou pozici pro zpracování molekul vstupujících do buňky. Jejich přeskupení do nitra buňky tak může reprezentovat ztrátu závislosti na folikulárním (vnějším) prostředí a ztrátu mezibuněčných spojů (Cran, 1985). Velké množství mitochondrií je přítomno také v pólovém tělísku (Sun et al., 2001). Počet mitochondrií v cytoplazmě oocyty je důležitý pro úspěšné oplození a průběh embryonálního vývoje (Shourbagy et al., 2006).

Mezi *zona pellucida* a oolemou se nachází tzv. periviteliní prostor. Je zde přítomno mnoho extracelulární matrix, bohaté na hyaluronan. U nezralých oocytů je tento prostor relativně malý, po vydělení pólového tělíska se stává asymetrickým (zvětšení v místě vydělení) a jeho velikost už se do fertilizace nemění. Hyaluronan může inhibovat fúzi membrán a proto musí být tato vrstva zdolána oplozující spermií (Talbot et Dandekar, 2003).



Obrázek 3: Prasečí oocyt v metafázi II (barvený orceinem, kultivovaný 42 hodin *in vitro*). Uprostřed buňky se nachází chromozomy, uspořádané v metafázní destičce. Spodní šipka ukazuje na vydělené pólové tělísko (Yuan et Krisher, 2012).

Po proběhnutí LH vlny tedy dochází ke konečné formaci periviteliního prostoru. V cytoplazmě oocyty se nadále zvyšuje obsah lipidů a je dále redukován golgiho aparát. Kortikální granula se uspořádají uvnitř membrány oocyty, dojde k obnovení meiózy, takže se jádro oocyty rozpadá, přičemž uvolňuje jaderný obsah do cytoplazmy (Fair, 2003).

Plná zralost oocyty zahrnuje 2 aspekty: jadernou zralost a cytoplazmatickou zralost. Obecně je oocyt považován za zralý, má-li vydělené první pólové tělísko, což značí jadernou

zralost, a jeho vývoj je pozastaven v MII fázi. Ačkoliv mohou být pouze jaderně zralé oocyty oplodněny, nemusejí být vývojově kompetentní, vzhledem k nedostatku či absenci některých cytoplazmatických faktorů, nezbytných pro úplnou cytoplazmatickou zralost. Pro plný vývojový potenciál je nutná synchronizace jaderného a cytoplazmatického (do)zrání. Indexem dosažení cytoplazmatické zralosti bývá intracelulární hladina glutationu, schopnost cytoplazmy dekondenzovat jádro spermie nebo indukovat vznik samčího prvojádra (Sun et Nagai, 2003).

Pokud po ovulaci dojde k fertilizaci nebo partenogenetické aktivaci, oocyty dokončují meiózu. V anafázi meiózy II se sesterské chromatidy oddělují v místě centromery a putují k opačným pólům dělicího vřeténka. Tam se v telofázi II shromažďují, vznikají nová dceřinná jádra, z nichž každé obsahuje haploidní sadu chromozomů. Dochází k vydělení druhého pólového tělíska (Snustad et Simmons, 2009).

3.2 Regulace oogeneze

3.2.1 Vstup do meiózy I

Oogeneze je regulována ve všech důležitých dílčích fázích, počínaje vstupem oogonií do meiózy I. Ten je mimo jiné zřejmě řízen kyselinou retinovou, produkovanou v mezonefros vyvíjejícího se embrya. Citlivost oogonií na kyselinu retinovou je řízena genem *cyp26b1*, podle něž se tvoří enzym cytochrom P450, metabolizující tuto kyselinu. Jakmile se tento gen přestane exprimovat, kyselina retinová se neodbourává a indukuje nástup meiózy. Anatomické uložení mezonefros pak zřejmě ovlivňuje vytvoření gradientu kyseliny retinové ve vyvíjejících se gonádách, který má vliv na vlnový charakter vývoje oogonií (Jones, 2008).

3.2.2 Regulace prvního meiotického bloku

Aby nedošlo k předčasnému obnovení meiózy, zatímco jsou oocyty v meiotickém bloku, je aktivně inhibována. Udržení meiotického bloku ve stadiu zárodečného váčku je zajištěno stálou vysokou hladinou cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), který do oocytu může procházet ze somatických buněk folikulu. Oocyty samy však mohou generovat dostatečné množství cAMP pro udržení meiotického bloku. *In vitro* klesá hladina cAMP po opuštění folikulu. *In vivo* se zvyšuje katalytická aktivita oocyt-specifické fosfodiesterázy (PDE3A) po proběhnutí LH vlny. Tento enzym degraduje oocytární cAMP, čímž nepřímo aktivuje proteiny, iniciující obnovení meiózy. Cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), produkovaný v granulóznicích buňkách a dopravovaný do oocytu přes kumulární buňky prostřednictvím

spojů gap junctions, inhibuje PDE3A a tím zabraňuje snížení hladin cAMP v oocytu a následnému rozpadu zárodečného váčku. LH vlna způsobuje pokles hladin cGMP, tím dojde ke stimulaci aktivity PDE3A, čímž se uvolní inhibiční efekt cAMP na obnovení meiózy (Norris et al., 2009).

Jako klíčový kontrolní systém během maturace myších oocytů slouží natriuretický peptid typu C (CNP). Ten je spolu s dalšími typy natriuretických peptidů a jejich receptorů exprimován i v granulóznicích a thekálních buňkách prasečích ovarii. BNP (brain natriuretic peptide) a CNP tedy zřejmě pomáhají ve fyziologických podmínkách zajistit meiotický blok také prasečích oocytů, slouží tedy jako inhibitory jejich maturace. Tento inhibiční efekt je opět přerušen vlnou LH, která *in vivo* snižuje expresi BNP a CNP a pod jejímž vlivem dochází k vystoupení z meiotického bloku (Zhang et al., 2015).

Pro kondenzaci chromatinu a rozpad zárodečného váčku u prasečích oocytů je nezbytná aktivní transkripce a translace. Obnovení meiózy je doprovázeno značným zvýšením aktivity kináz v cytoplazmě oocytu. Jde především o aktivaci MPF (mature promoting factor), která spouští řadu reakcí, vedoucích k rozpadu jaderné membrány, kondenzaci chromozomů a tvorbě dělicího vřetena (Hunter, 2000). Dosažení meiotické kompetence rostoucích oocytů je tedy závislé na schopnosti aktivace MPF. Jde o molekulu, zásadní při řízení obnovení meiózy. MPF se skládá ze 2 podjednotek, cyklin dependentní kinázy p34cdc2 a cyklinu B. Množství těchto podjednotek je v rostoucích oocytech srovnatelné s jejich množstvím v plně dorostlých oocytech. Neschopnost obnovení meiózy malých oocytů tedy není zapříčiněna nedostatkem MPF, rostoucí oocyty však obsahují fosforylovanou p34cdc2, a nejsou tak schopné aktivace MPF před dokončením růstu. Vystoupení z 1. meiotického bloku je tedy závislé na schopnosti defosforylace MPF (Sun et Nagai, 2003).

Ačkoliv MPF hraje při znovuzahájení meiózy důležitou roli, své zastoupení v něm mají i další kinázy, které jsou aktivovány současně s nebo před MPF. Jde především o MAP kinázy (mitogenem aktivované proteinkinázy), které fosforylují cytoskeletální proteiny a jaderné laminy, což jsou zásadní události meiotického dělení (Wehrend et Meinecke, 1998). Fosforylace MAPK v prasečích oocytech koresponduje s časem rozpadu zárodečného váčku a aktivace MPF. Gonadotropní hormony (LH a folikulostimulační hormon FSH) působí intenzivnější fosforylací MAPK. K fosforylaci MAPK dochází také v kumulárních buňkách, obklopujících oocyt (Ebeling et al., 2007).

Důležitým regulátorem obnovení meiózy je také aktivita Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní kinázy II. Při inhibici její aktivity nedochází během meiotického zrání k akumulaci cyklinu B

a plné fosforylaci MAPK, což může mít negativní vliv na vystoupení z meiotického bloku a správnou tvorbu dělicího vřeténka (Fan et al., 2003a).

Také Greatwall kináza (GWL) je nezbytná pro vstup do M-fáze a může navodit aktivitu cyklin-B/cdc2 přes regulaci proteinové fosfatázy 2A (PP2A), která působí proti MPF. GWL je nezbytná pro meiotické zrání myších oocytů. Je to pozitivní regulátor obnovení meiózy, kontinuálně exprimovaný v oocytech ve stadiu GV a metafáze II (MII). GWL je lokalizována v jádře a během GVBD se uvolní do cytoplazmy. Snížená exprese GWL nebo zvýšená exprese katalyticky inaktivní GWL částečně inhibuje meiotické zrání. Meiotický blok, indukovaný vyblokováním GWL, může být zrušen inhibicí PP2A. Takové oocyty ale mívají deformovaná vřetena a jen těžko dosahují MII fáze (Zhao et al., 2014).

Faktorem, který podporuje vystoupení z meiotického bloku, je také aktivace cyklin dependentní kinázy 1 (Cdk1). K její aktivaci dochází pomocí dvou mechanismů. Jednak díky snížení aktivity protein kinázy A (PKA) a na ní závislé syntéze proteinů, která generuje množství Cdk1. Dochází však také k iniciaci regulačního mechanismu, známého jako MPF auto-amplifikační smyčka (nezávisle na PKA a syntéze proteinů). Nejprve dojde k vygenerování určité prahové úrovně aktivovaného MPF. To je závislé na schopnosti Cdk1 fosforylovat své vlastní regulační enzymy (Cdc25, Wee1/Myt1). Jakmile je přítomno dané množství aktivovaného MPF, může fosforylovat Wee1/Myt1 a Cdc25, což zajistí jejich inhibici, respektive aktivaci. Tento mechanismus pozitivní zpětní vazby zvyšuje aktivitu Cdk1 a podílí se tak na obnovení meiózy (Dupré et al., 2013).

Cdk1 také fosforyluje proteiny, důležité pro rozpad jaderné membrány, kondenzaci chromozomů a remodelaci aktinového a mikrotubulárního cytoskeletu. Důsledkem je vytvoření bipolárního vřetena a kondenzované chromozomy se seřadí v metafázové ploténce (v ekvatoriální rovině). SAC (spindle assembly checkpoint) zabraňuje aktivaci anafázi podporujícího komplexu/cyklosomu (APC/C^{Cdc20}) v průběhu meiózy I, dokud nejsou všechny kinetochory pod tlakem (napnuté). Když k tomuto dojde, aktivuje se SAC a APC/C a fosforyluje cyklin B a securin. Degradace cyklinu B snižuje aktivitu Cdk1 a degradace securinu aktivuje separasu, která rozpojí sesterské chromatidy. Po cytokinezi zůstává jedna sada chromozomů v oocytu a druhá je vydělena do pólového tělíska. Po dokončení meiózy I dochází k prudkému zvýšení aktivity Cdk1, což zabraňuje vstupu do S fáze a oocyty tak vstupují rovnou do meiózy II. Při tomto přestupu zůstávají spojené sesterské chromatidy kondenzované, tvoří se typická bipolární metafázová vřetena. (Adhikari et al., 2015).

3.2.3 Regulace druhého meiotického bloku

Vysoké hladiny MPF a MAPK aktivity v oocytech savců ve stadiu metafáze meiózy II působí jako cytostatický faktor a způsobují v této fázi zastavení buněčného cyklu. V MII oocytech se zastavenou meiózou dosahuje MPF nejvyšší aktivity, následná schopnost znovuzahájení meiózy je závislá na snížení aktivity MPF (Kikuchi et al., 2002). Inaktivace MPF a degradace cyklinu B navíc koresponduje s přestupem oocytů ze zastavené MII fáze do anafáze II a telofáze II (Miyano et al., 2000). Důležitou roli v zastavování buněčného cyklu v MII fázi hrají také MAPK a p⁹⁰rsk (MAPkinázou aktivovaná proteinkináza 1). Jsou-li inaktivované inhibitory kinázy MAPkinázy (MEK) U0126, dojde k uvolnění MII bloku a oocyty přestupují do interfáze (Fan et al., 2003b).

3.3 Folikulogeneze

3.3.1 Primordiální folikul

Primární oocyty, jejichž buněčný cyklus je zastaven v 1. profázi meiózy, se obklopují vrstvou 4-8 pregranulózních buněk a intaktní bazální membránou, čímž vytvoří základní typ folikulů, a to klidové primordiální folikuly. Pregranulózní buňky jsou zřejmě jak mezonefrického, tak mezoteliálního původu. Oocyty obklopené primordiálními folikuly, tvoří konečnou zásobu oocytů, která zůstane v klidové fázi, pokud nedostane stimul k dalšímu růstu (Fair, 2003).

Při narození prasničky obsahují její vaječníky 500 000 primordiálních folikulů, do nástupu puberty pak jejich počet klesá na přibližně 420 000 (Hunter, 2000).

Množství primordiálních folikulů narůstá u prasečích plodů mezi 70. a 90. dnem vývoje, poté následuje pokles v jejich množství z důvodu přeměny na folikuly primární (Ding et al., 2010).

Soustředění oocytů v primordiálních folikulech má význam pro jejich další přežití (Richardson et al., 2014). Jelikož je vývoj oocyty regulován parakrinními faktory z granulózních buněk, oocyty bez spojení s granulózními buňkami nemohou *in vivo* růst (Hunter, 2000).

Mezi membránou oocyty a granulózních buněk, které ho obklopují je propojení spoji gap junctions. Tyto spoje zajišťují přenos malých molekul (<1 kDa), mj. aminokyselin, metabolitů glukózy a nukleotidů, do rostoucího oocyty. Gap junctions spoje jsou tvořeny proteiny konexiny. V různých stádiích vývoje folikulu přitom mohou být přítomny různé typy konexinů. Jejich exprese je spojena s proliferací granulózních buněk. Konexin, potažmo spoje gap junctions, jsou zásadní/nezbytné pro růst, vývoj (zajištění fosforylace proteinů) a zrání oocyty. Míra růstu oocyty je přímo úměrná počtu granulózních buněk, propojených s oocytem (Fair, 2003).

Primordiální folikuly postupně buď zanikají, nebo podléhají recruitmentu a dochází k jejich dalšímu růstu. V tom případě dochází k nevratné aktivaci primordiálního folikulu. Po aktivaci folikulů už nenastává žádné klidové stadium, folikuly se kontinuálně vyvíjejí a následně ovulují, nebo v průběhu vývoje zanikají (Coticchio et al., 2013). Případný další růst folikulů by se mohl uskutečňovat na vaječníku podle určitého vzoru, a to centrifugálně (Byskov et al., 1977).

Ačkoliv je možné, že se některé somatické (kmenové) buňky mohou usídlit na ovariiích a dát tak základ novým oocytům/primordiálním folikulům i během života samice

(Bukovský, 2005), stále převládá názor, že počet primordiálních folikulů, vzniklých během fetálního vývoje, je konečný a během života samice nové primordiální folikuly nevznikají (Coticchio et al., 2013).

3.3.2 Primární folikul

Aktivace primordiálního folikulu (jeho přeměna na folikul primární) je charakterizována přeměnou jeho granulózních buněk z plochých na kubické a jejich proliferací. Primární folikul je tvořen vrstvou 11-20 kubických buněk (Fair, 2003).

3.3.3 Sekundární folikul

Změna primárního v sekundární folikul je charakterizována vytvořením druhé vrstvy granulózních buněk a počáteční distribucí komponent *zona pellucida* na povrch oocyty. V této fázi vývoje začínají být folikuly citlivé na gonadotropiny. V sekundárních folikulech je poprvé detekována syntéza oocytární RNA (Fair, 2003).

3.3.4 Terciární folikul

Změna sekundárního v terciární folikul je charakteristická pokračující proliferací a diferenciací buněk, obklopujících oocyt. Dochází k diferenciaci thekálních buněk v *theca folliculi externa* a *theca folliculi interna*, diferenciaci kumulárních buněk a bazální membrány a formaci antrální dutiny, vyplněné tekutinou. Na buňkách *theca folliculi interna* dochází k expresi LH receptorů. Oocyty v ranných terciárních folikulech jsou transkripčně aktivní a obsahují alespoň jedno aktivní jádro (Fair, 2003).

Thekální buňky produkují androgeny, které jsou v granulózních buňkách pomocí aromatázy přeměňovány na estrogény. Oproti mnoha jiným živočišným druhům však thekální buňky prasečích ovarí samy produkují také estrogény a to v množství, srovnatelném s jejich produkcí granulózními buňkami (Foxcroft et Hunter, 1985).

Jakmile je ustanoven dominantní folikul, dochází u jeho oocyty k některým ultrastrukturálním změnám. Také dochází k prodloužení buněk *corona radiata* (kumulární buňky, těsně obklopující oocyt) z důvodu jejich přesunu co nejbliž k povrchu oocyty (Assey et al., 1994). Po proběhnutí LH vlny dominantní folikul dále roste a jeho oocyt podstupuje finální maturaci. Dochází k expanzi kumulu a přerušení kontaktu mezi buňkami *corona radiata* a folikulárními buňkami (Pincus et Enzmann, 1935).

Kumulární buňky jsou *in vivo* nezbytné pro správný vývoj oocyty. V *in vitro* podmínkách zrají a mohou být oplodněny i prasečí oocyty bez kumulárních buněk

(Kubo et al., 2015). Před ovulací syntetizují kumulární buňky, obklopující oocyt, velké množství hyaluronanu. Ten způsobí expanzi kumulárních buněk. Expandovaný kumululus pak zajišťuje přirozené mikroprostředí, vhodné pro uskutečnění fertilizace (Mlynářčiková et al., 2009). Schopnost expanze kumulu je získávána během růstu oocyty a je řízena parakrinními a apokrinními faktory, odvozenými z kumulo-oocytárních komplexů. Z toho důvodu (mj.) je důležité spojení kumulárních buněk s oocytem (Kubo et al., 2015). Pro expanzi kumulo-oocytárního komplexu během maturace oocyty jsou nezbytné proteiny vázající hyaluronovou kyselinu (HABPs). Expanze kumulu začíná během preovulačního období, kdy je syntetizováno a sekretováno velké množství glykosaminoglykanů. Tyto glykosaminoglykany (GAGs) interagují se specifickými komponenty matrix, čímž tvoří síť vysoce hydratované a viskoelastické matrice v extracelulárním prostředí. Expanze kumulu umožňuje oddělení kumulo-oocytárního komplexu od stěny folikulu, jeho vytlačení/extruzi a ovulaci, zachycení fimbriemi vaječníku a podporuje akrozomální reakci spermií. Podobně, jako expanduje kumululus ve folikulu *in vivo*, může expandovat i během *in vitro* maturace pod vlivem gonadotropinů (Yokoo et al., 2002).

Hlavní složkou expandovaného kumulu je kyselina hyaluronová (HA). Množství syntetizované kyseliny hyaluronové úzce souvisí se stupněm/mírou expanze kumulu. HA je lineární glykosaminoglykan. Přestože jde o látku strukturně jednoduchou, kyselina hyaluronová je důležitý biopolymer, který je široce rozšířený v extracelulární matrix pojivových tkání těla a hraje důležitou roli v procesech, jako je hojení ran, motilita buněk či metastázování rakoviny. Na rozdíl od ostatních GAGs není HA sulfatovaná ani spojována s jiným proteinem. Proto potřebuje HABPs, které mají vysoce homologní sekvence pro navázání HA, a následně tvoří extracelulární matrix bohatou na HA. Zásadní pro expanzi kumulu a maturaci oocyty je pravděpodobně 85-kDA HAPB (Yokoo et al., 2002).

3.4 Regulace folikulogeneze

Folikuly mohou začít růst během jakéhokoliv věku samice, ještě před dosažením pohlavní dospělosti, a růst probíhá v průběhu celého reprodukčního života, přes pubertu, březost, až do období menopauzy (Peters, 1969).

Během růstu folikulů je u prasat produkováno velké množství růstových faktorů a jejich receptorů. Jejich funkce však často nejsou plně objasněny (McNatty et al., 1999).

Mnoho kroků oogeneze a folikulogeneze je zřejmě ovlivněno interakcí mezi receptorem c-Kit a jeho ligandem. Jedním z nich by mohla být také iniciace růstu folikulů při jejich

přeměně z primordiálních v primární folikuly. Dále jsou zodpovědné za růst oocytu a diferenciaci thekálních buněk folikulu. Také mohou bránit apoptóze preantrálních folikulů. Mimo to i tvorba antrální dutiny folikulu je závislá na funkční regulaci receptorem c-Kit a jeho ligandem (Driancourt et al., 2000).

Do tvorby zásoby primordiálních folikulů jsou pravděpodobně zapojeni i členové rodiny transformujícího růstového faktoru β (TGF β), jako jsou kostní morfogenetické proteiny (BMPs) a členové rodiny B-cell lymphoma/leukemia-2 (bcl-2), což jsou protoonkogeny (Fair, 2003).

Anti-müllerian hormon může potlačovat recruitment primordiálních folikulů, určených k dalšímu růstu, a udržovat tak rovnováhu mezi množstvím rostoucích a klidových stadií folikulů (Durlinger et al., 2002).

Aktivaci primordiálního folikulu mohou stimulovat faktory, podporující proliferaci buněk. Jde např. o bone morphogenic protein 7 (BMP-7), který podporuje dělení granulózních buněk, což je potvrzeno u hlodavců (Lee et al., 2001). IGF-I (insulin-like growth factor 1) a jeho efekt na stimulaci proliferace a diferenciaci granulózních buněk naznačuje, že by také mohl být zapojen v aktivaci primordiálních folikulů. Další růstové faktory pak mohou upravovat aktivitu IGF-I. Například vysoké hladiny EGF (epidermální růstový faktor) v malých folikulech mohou podporovat IGF-I ve stimulaci proliferace granulózních buněk a nízké hladiny EGF ve větších folikulech mohou mít vliv na diferenciaci granulózních buněk (Fair, 2003).

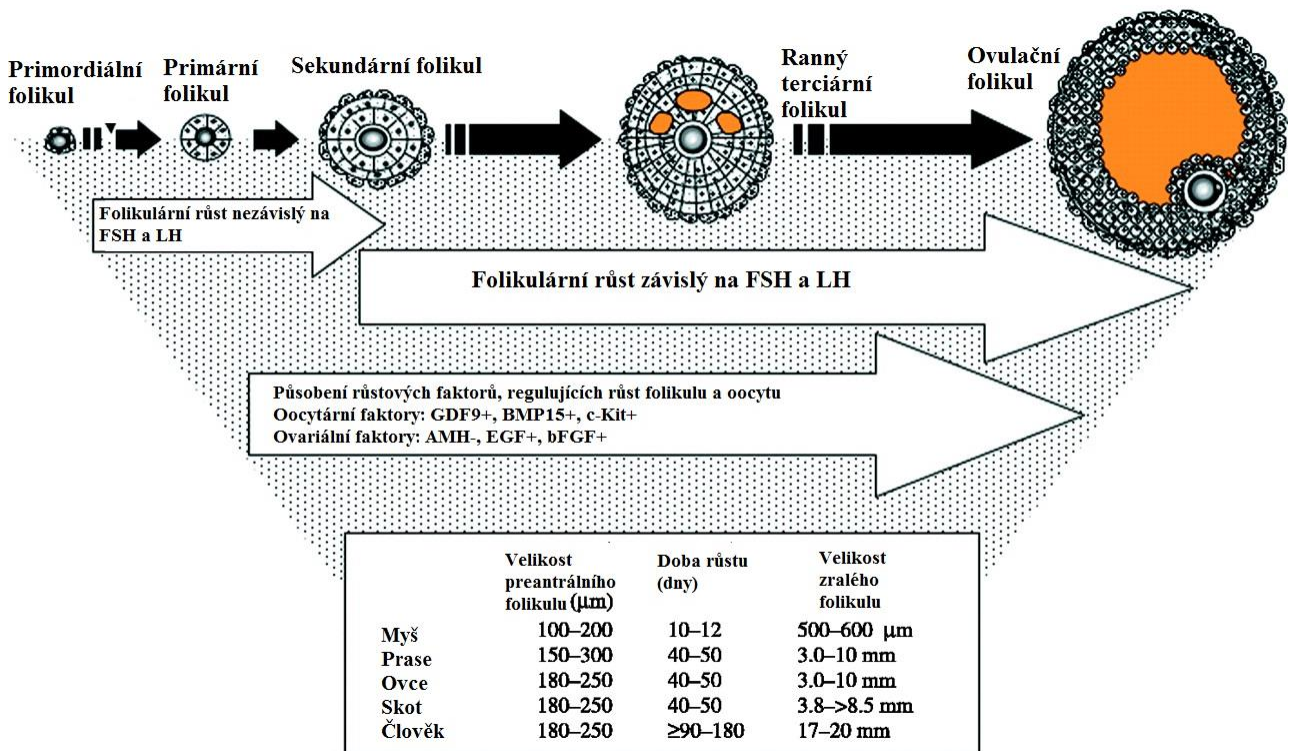
Různé další, lokálně působící faktory, mohou mít vliv na změnu primordiálních folikulů v primární, a to např. základní fibroblastový růstový faktor (bFGF), leukemický inhibiční faktor (LIF) a BMP-15 (kostní morfogenetický protein 15) (Fair, 2003). Řídící silou v podpoře vývoje primordiálních folikulů v primární folikuly je však zřejmě oocyt samotný. Například přes jeho růstový a diferenciacní faktor-9 (GDF-9) z rodiny transformujících růstových faktorů β . Jeho exprese byla zjištěna v primárních folikulech myši, potkanů a lidí a v primordiálních a následujících stadií folikulů skotu a ovcí. Působí pravděpodobně přes podporu progresu primárních folikulů do preantrálních stadií, čímž může nepřímo stimulovat primordiální folikuly ke změně v primární folikuly. Při vyblokování genu pro GDF-9 u myši nepokračuje vývoj folikulů přes primární stadium (Dong et al., 1996).

V regulaci folikulogeneze se uplatňuje oxid dusnatý (NO). Ten je zapojen do řízení apoptózy granulózních buněk na vaječnicích a steroidogenní aktivity granulózních a luteálních buněk. Steroidogenezi může regulovat přímo inhibicí cytochrom P450 aromatázy (po navázání na iron-containing enzymes), což je klíčový enzym v biosyntéze estradiolu.

V prasečích ovariích je funkční NO/NOS (syntáza oxidu dusnatého) systém a NO tak hraje parakrinní/apokrinní roli ve fyziologii ovarií (Graselli et al., 2001).

Ačkoliv na folikuly působí v průběhu vývoje velké množství parakrinních a autokrinních faktorů, růst a vývoj sekundárních folikulů v terciární a zralé, ovulační folikuly, je závislý na hormonální regulaci. Působení hormonů však může být některými extra- či intra-ovariálními faktory omezeno. V regulaci vývoje ovulačních folikulů se uplatňují především gonadotropní hormony. V průběhu vývoje se na thekálních buňkách folikulů hromadí receptory pro luteinizační hormon. Ty se v období před ovulací tvoří také na granulózních buňkách folikulů. Nejvyšší množství těchto receptorů je pozorováno 1-2 dny před ovulací (Foxcroft et Hunter, 1985). Růst folikulů je po vytvoření antrální dutiny řízen folikulostimulačním hormone. U prasniček začínají folikuly intenzivně růst mezi 60 a 100 dny věku, výkyvy ve velikostech folikulů trvají asi 20 dní. V tomto věku se však ještě netvoří skutečně velké (ovulační) folikuly, jelikož to je řízeno LH, který se ve větší míře začíná uvolňovat až se zvýšeným působením estrogenů s nástupem puberty (Schwarz et al., 2008).

Obrázek 4: Vývoj savčího folikulu *in vivo*. U působení růstových faktorů + značí stimulační a – inhibiční efekt. Převzato a upraveno dle Picton et al., 2008.



3.5 Endokrinní disruptory

Obecně lze říci, že endokrinní disruptory (EDs) jsou látky, které mohou zasahovat do tělního endokrinního systému a způsobovat nepříznivé vývojové, reprodukční, neurologické či imunitní efekty u lidí i zvířat (NIEHS, 2017).

EDs jsou tedy exogenní agens, jež ovlivňují syntézu, sekreci, transport, metabolismus, navázání nebo eliminaci přirozených hormonů těla, které jsou zodpovědné za homeostatické, reprodukční a vývojové procesy. Z fyziologického hlediska jde o přírodní či syntetické látky, které prostřednictvím environmentální či nevhodné vývojové expozice narušují hormonální a homeostatické systémy, které umožňují organismu komunikovat s prostředím či reagovat na jeho změny (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Mezi EDs se řadí jak farmaceutika či některé pesticidy (např. DDT) a fungicidy (např. vinclozolin), tak průmyslová rozpouštědla a mazadla s jejich vedlejšími produkty (jako jsou polychlorované či polybromované bifenyly nebo dioxiny) či změkčovadla plastů (např. bisfenoly či ftaláty). Z přírodních látek lze mezi endokrinní disruptory zařadit fytoestrogeny, jako jsou genistein, kumestrol či daidzein (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; NIEHS, 2017).

EDs se vyskytují v řadě výrobků denní potřeby, jako jsou plastové lahve, plechovky s jídlem, detergenty, retardanty hoření, jídlo, hračky, kosmetika, či pesticidy (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; NIEHS, 2017).

Do těla se EDs dostávají skrz potravu, prach či vodu, inhalací plynů a částic ve vzduchu a také prostupem kůží. Mohou se předávat potomkům přes placentu a mateřské mléko (WHO, 2016).

Endokrinní disruptory ovlivňují biosyntézu, signalizaci či metabolismus hormonů. Mnoho z nich se chová jako agonisté či antagonisté steroidních hormonů, zejména s ohledem na estrogenicitu a androgenicitu. Mohou také ovlivňovat produkci steroidních hormonů ovlivněním steroidogeneze (Richardson et al., 2014).

Děti jsou k efektům environmentálních toxinů vnímavější, než dospělí, jelikož mají dosud neúplně vyvinuté metabolické dráhy. Liší se tedy jejich schopnost metabolizovat, detoxikovat a eliminovat toxiny z těla. Nejvnímavější jsou v tomto ohledu děti v prvních měsících života (Usman et al., 2016).

Xenoestrogeny (chemické látky, které nejsou tělu vlastní, ale svými biologickými účinky napodobují estrogeny a mezi něž se řadí mnoho EDs) mohou ovlivnit fungování řady tkání přes negenomické signální dráhy a mají vliv také na působení endogenních estrogenů.

Aktivita xenoestrogenů byla testována také v souvislosti s jadernými receptory pro estrogen, zprostředkovaná genová transkripce však byla často velmi slabá, přibližně 1000x slabší, než působení estradiolu (Watson et al., 2010).

Původní předpoklad, že endokrinní disruptory v těle působí pouze prostřednictvím jaderných receptorů, mj. pro estrogeny, androgeny, progesteron, thyroïdní či retinoidní receptory, je již překonán. V současné době bylo potvrzeno, že spektrum působení těchto látek je mnohem širší. Endokrinní disruptory působí skrze jaderné receptory, nejaderné receptory steroidních hormonů (např. na membráně endoplazmatického retikula), nesteroidní receptory (jako jsou receptory neurotransmiterů, např. serotoninový receptor, dopaminový receptor, norepinephrinový receptor apod.), „sirotčí“ receptory, enzymatické dráhy biosyntézy či metabolismu steroidů a množství dalších mechanismů, které propojují endokrinní a reprodukční systémy. Neomezují se tedy na působení genomické, ale mají i negenomické účinky (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Síla a způsob působení EDs jsou ovlivněny několika skutečnostmi. Endokrinní disruptory působí rozdílně na dospělého a plod či mládě, záleží tedy na věku, v kterém byl jedinec působení těchto látek vystaven. Mezi expozicí endokrinním disruptorům a manifestací případné poruchy může být dlouhá časová prodleva. Působení EDs mohou navíc ovlivňovat další látky, přítomné v prostředí. Kontroverzní je fakt, že jakákoliv dávka endokrinního disruptoru, a to i velice malá, může způsobit endokrinní či reprodukční abnormality, zejména pokud tato expozice probíhá během kritického období vývoje jedince (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Nízké koncentrace EDs mohou překvapivě navozovat silnější efekty, než koncentrace vysoké (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Tento efekt může být způsoben vlivem koncentrace endokrinních disruptorů na množství „jejich“ receptorů. V případě, kdy je degradováno větší množství receptorů, než vzniká, totiž očekáváme sníženou odpověď na ligand a to i v případě zvyšování jeho koncentrace (von Zastrow et Kobilka, 1994).

Důležitá je také skutečnost, že EDs neovlivňují pouze jedince, který jim byl vystaven, ale jejich efekt se přenáší také na potomky a následující generaci. Tyto efekty nemusí být přenášeny z důvodu mutace DNA, ale spíše přes modifikace faktorů, které regulují genovou expresi (jako je metylace DNA a acetylace histonů, tedy epigenetické mechanismy) (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

3.5.1 Bisfenoly

3.5.1.1 Bisfenol A (BPA)

Ačkoliv byl BPA prvním syntetickým estrogenem bez steroidního jádra, nenašel využití jako léčivo, ale začal se používat ve výrobě plastů. Používá se již od roku 1940, zprvu jako komponent epoxidových pryskyřic, později pro tvorbu tvrdých plastů, polykarbonátů. To umožňuje jeho použití při výrobě obalů na vodu a potraviny, dětské lahve nevyjímaje (Usman et al., 2016).

S rozvojem a urbanizací zemí v celosvětovém měřítku docházelo k zvýšení výrobních požadavků na balení potravin a nápojů, papírových obalů, výrobu zdravotnického náčiní, elektroniky, zpomalovačů hoření, lepidel, stavebních materiálů, automobilů apod. Důsledkem byla významně zvýšená spotřeba BPA, která v průběhu více než 60 let stále narůstá (Corrales et al., 2015).

BPA je s produkcí kolem 3,4 milionů tun BPA za rok celosvětově jednou z nejvíce produkováných chemikálií (Cano-Nicolau et al., 2016). Používá se především při výrobě polymerů, jako jsou polykarbonáty, epoxidové pryskyřice, polysulfony či polyakryláty. Dále při výrobě polyvinylchloridových plastů a retardantů hoření, jako je např. tetrabromobisfenol-A. Tolerovaný denní příjem BPA v USA je 0,05 mg/kg/den, v EU pak 10 µg/kg/den (Rezg et al., 2014).

Bisfenol A je alkylfenol, což je skupina všudypřítomných environmentálních estrogenů, které se strukturou podobají estradiolu. Jde o povrchově aktivní látky nebo, jako v případě BPA, vedlejší produkty při výrobě plastů. Tyto látky jsou aktivní již ve velmi malých dávkách (femtomoly až nanomoly). Mnoho xenoestrogenů se přirozeně akumuluje v tukové tkáni, odkud se dlouhodobě postupně uvolňují, což prodlužuje jejich expozici organismu (Watson et al., 2010).

Hlavním zdrojem expozice BPA u lidí je pravděpodobně strava, jelikož polykarbonáty jsou základem nejrůznějších plastových obalů potravin, z nichž se BPA uvolňuje (Rezg et al., 2014). Konkrétně se BPA nachází v množství výrobků, jako jsou dětské lahve, recyklova(tel)né lahve a obaly potravin, vnitřní epoxidová vrstva uvnitř potravinových konzerv apod. (Soto et al., 2010). Zahřátí materiálu pak uvolňování BPA zvyšuje, ať už jde o vysokou teplotu při sterilizaci (Krishnan et al., 1993) nebo uskladňování horkého jídla či vody (Rezg et al., 2014). Významný přestup BPA z materiálu však nastává i při pokojové teplotě (Howdeshell et al., 2003). Druhým nejčastějším zdrojem BPA u lidí je kožní kontakt

s papírovými produkty, především pak s termálně tištěným papírem, jako jsou účtenky apod. (Rezg et al., 2014).

BPA se může uvolňovat také ze zubních výplní na bázi bisfenolglycidylmetakrylátu. Toto uvolňování je krátkodobé a po půl roce již nedetekovatelné (Maserejian et al., 2016).

BPA je u většiny lidí přítomen v měřitelném množství jak v moči, tak krevním séru (Mileva et al., 2014). V lidské populaci se detekce bisfenolu A provádí nejčastěji ve vzorcích moči. V letech 2003-2004 byl BPA zjištěn ve vzorcích moči 92 % referenční skupiny obyvatel USA. Šlo o vzorky 2517 osob. Koncentrace BPA se lišila v závislosti na etniku, věku, pohlaví a příjmu domácnosti. Nejnižší koncentrace byla naměřena u hispánců, vyšší u černochů a nejvyšší u bělochů. U žen byly hladiny vyšší, než u mužů. U dětí byly hladiny vyšší, než u adolescentů, u dospělých pak byly nejnižší. Domácnosti s vysokým příjmem vykazovaly nižší hladiny BPA, než u obyvatel domácností s nižším příjmem (Calafat et al., 2008).

BPA se může vázat na některé membránové a transmembránové receptory a spouštět tak negenomické signální dráhy, které vedou k modifikaci regulačních proteinů (Mileva et al., 2004). Na tyto receptory je schopen se vázat už při mnohem nižších koncentracích (v rámci nanomolů), než na receptory jaderné (Usman et al., 2016). Negenomickou cestou ovlivňuje například fosforylační aktivitu MAP kinázy. Při velmi nízkých dávkách BPA je její aktivita vysoká, se zvýšením koncentrace se snižuje, avšak s dalším zvýšením koncentrace dochází opět k vzestupu její aktivity (Kochukov et al., 2009).

Expozice BPA je spojována s řadou nepříznivých zdravotních problémů, jako jsou vývojové vady, diabetes, obezita, kardiovaskulární choroby, reprodukční poruchy, poruchy chování, chronická dýchací a ledvinová onemocnění a vznik nádorů (Vandenberg et al., 2012).

Významně je BPA spojován s mnohými negativními vlivy na reprodukci samic zvířat i lidí. V buňce může BPA indukovat vznik mikrojader, modifikovat funkci mikrotubuly organizujících center (MTOC) mitotických vřetének a narušit proces opravy dvouvláknových zlomů DNA. Může způsobovat též epigenetické změny, jako je hyper- či hypometylace DNA (Rezg et al., 2014). Při kultivaci myších oocytů BPA způsobuje narušení či inhibici meiotického zrání. To je pravděpodobně způsobeno selektivní interakcí s centrozomem a mikrotubuly. V důsledku disorganizace a fragmentace mikrotubulů dochází ke tvorbě defektních dělicích vřetének (Can et al., 2005). Při *in vitro* maturaci oocytů tura domácího (*Bos taurus*) dochází k omezenému zrání oocytů a většímu výskytu abnormálních dělicích vřetének (Ferris et al., 2015). Také při kultivaci lidských oocytů *in vitro* BPA způsobuje jejich

degeneraci, kdy oocyty vykazují deformovaná jádra. Vyskytuje se u nich také negativní efekt na průběh meiózy, který je významně opožděn (Brieño-Enríquez et al., 2011).

Pod vlivem BPA může docházet také u prasečích oocytů k narušení meiotického zrání. Výsledky studie Mlynarčíkové et al. (2009) naznačují, že se může snížit procentuální podíl oocytů, které po 44 hodinách kultivace podstupují rozpad zárodečného váčku i podíl oocytů, které dosáhnou metafáze II. V této studii byla vlivem BPA redukována i FSH-stimulovaná expanze kumulu. Ačkoliv BPA přímo neovlivňuje syntézu hyaluronanu kumulárními buňkami, přesto expandovaný kumululus obsahoval jen polovinu množství hyaluronanu oproti kontrolním oocytům, neošetřeným BPA (Mlynarčíková et al., 2009).

U myši může mít vystavení březí samice působení BPA vliv na průběh meiózy i u embryonálních oocytů při tvorbě primárních folikulů dcer (Richter et al., 2007). Také u nich v rámci ovarí BPA negativně ovlivňuje zásobu primordiálních folikulů, vývoj folikulů a s ním spojenou steroidogenezi (Patel et al., 2015). Jakmile tyto samičí plody dosáhnou dospělosti, je u nich ve vyšší míře pozorován výskyt chromozomálně abnormálních oocytů a embryí (Susiarjo et al., 2007).

Při prenatálním vývoji mláďat BPA negativně ovlivňuje organizační vývoj mozku a chování u myši. Postupně se u těchto jedinců objevuje vyšší výskyt agresivity, hyperaktivity, dochází k narušení učení, mateřského chování, sexuálního chování apod. (Richter et al., 2007).

U dospělých samic druhu opic makak rhesus (*Macaca mulatta*) BPA potlačuje uvolňování kisspeptinů a GnRH (Kurian et al., 2015).

Působí-li BPA na březí samice myši, může docházet také k poruchám vývoje samčího reprodukčního systému plodu. BPA působí na varlata, kde způsobuje změny v sekreci testosteronu a produkci spermií, dále také na nadvarlata, prostatu a semenné váčky. K negativním změnám dochází také v rámci metabolických procesů: prenatální expozice mláďat BPA způsobuje zvýšení postnatální míry růstu. Po expozici BPA v prenatálním období dochází také ke zmenšení fenotypových rozdílů mezi pohlavími u mláďat. Efekt se přitom může různit v závislosti na tom, zda se jedná o samce či samici. To může být způsobeno tím, že metabolismus BPA je ovlivněn testosteronem a naopak, metabolismus testosteronu je ovlivňován BPA (Richter et al., 2007).

BPA je spojován s neplodností a opakovanými potraty u žen, jeho vliv na funkce dělohy během ranného těhotenství však zůstává nejasný. Li et al. (2016) prováděla výzkum na myších pro posouzení efektu dlouhodobé expozice BPA (koncentrace, běžná v životním prostředí) na implantaci a průběh březosti. Výsledkem byla špatná funkce děložního

endometria (epitelu a intersticia), která měla negativní vliv na implantaci embrya. Následné analýzy ukázaly, že v děložní tkáni pod vlivem BPA byla výrazně potlačená exprese progesteronových receptorů a genu HAND2, který má vliv na implantaci embrya díky potlačení fibroblastového růstového faktoru a MAPK signálních drah a inhibici proliferace epitelu. Potlačením exprese progesteronových receptorů a genu HAND2 tedy došlo ke zvýšené aktivitě fibroblastového růstového faktoru a MAPK signálních drah v buňkách epitelu dělohy, což vedlo k jeho nahodilé proliferaci a nedostatečné receptivitě děložní sliznice. Docházelo také k narušení diferenciaci intersticiálních buněk sliznice dělohy v deciduální buňky, což je nezbytné pro udržení březosti (Li et al., 2016).

3.5.1.2 Bisfenol S

S přibýváním důkazů o toxicitě bisfenolu A dochází v komerčních produktech k jeho nahrazování jinými sloučeninami (Liao et al., 2012b). Hlavními skutečnostmi, vedoucími k omezení, případně zákazu BPA, jsou rozsáhlá environmentální kontaminace BPA, která vede k nevyhnutelné expozici lidmi, a toxicita. Dále efekt nízké dávky (potažmo netradiční odpověď na dávku), který je zapříčiněn tím, že se BPA v těle chová jako hormon a musí tedy reagovat na přítomnost receptorů, která se dynamicky mění. S tím souvisí skutečnost, že BPA se chová jako endokrinní disruptor (Usman et al., 2016).

Bisfenol S byl prvně syntetizován v roce 1986, v konzumním zboží začal být využíván v roce 2006. Pro omezení BPA ho BPS nahradil ve výrobě epoxidových pryskyřic, termálního papíru a dětských lahví. BPS má dlouhý poločas rozpadu a přes kůži penetruje snadněji, než BPA, což může vést k většímu zatížení organismu, než při expozici BPA. V aerobních podmínkách je nedegradovatelný a akumuluje se ve vodním prostředí (Usman et al., 2016).

Vlivem bisfenolu S se *in vivo* zabývalo zatím relativně málo studií, ale výsledky z *in vitro* prostředí a studie provedené na rybách naznačují, že hormonální působení tohoto analogu BPA je srovnatelné s BPA (Rochester et al., 2015).

O výskytu BPS v životním prostředí je toho známo jen velmi málo. Vyskytuje se například v papíru a papírových produktech, jako jsou účtenky, papírové bankovky, letáky, časopisy, noviny, papírové obaly potravin, papírové utěrky či toaletní papír. Hlavním zdrojem BPS, kterému se lidé vystavují, jsou účtenky. Z nich se uvolní více než 88 % denního příjmu BPS. (Liao et al., 2012b).

Při studii, zkoumající vzorky moči od 315 lidí z 8 zemí světa (USA, Japonsko, Čína, Indie, Korea, Kuwait, Malajsie, Vietnam) byl BPS v měřitelném množství zjištěn v 81 % vzorků. Jeho koncentrace se pohybovala v širokém rozmezí až do 21 ng/ml. Nejvyšší

průměrná koncentrace bisfenolu v moči byla naměřena v Japonsku, následovalo USA a Vietnam. S výjimkou vzorků Japonska byla naměřená koncentrace BPS o řád nižší, než dříve naměřená koncentrace BPA. Nebyly zjištěny rozdíly v koncentraci BPS mezi pohlavími, věkovými skupinami ani rasami (Liao et al., 2012a).

Síla BPS v negenomických signálních drahách je zřejmě podobná působení BPA. Ve femtomolárních až pikomolárních koncentracích ovlivňuje například endoplazmatickým retikulem zprostředkované kaskády, signalizaci MAPK, buněčnou proliferaci či aktivaci kaspázy 8. Ty jsou důležité pro správné fungování buňky, její proliferaci a apoptózu (Rochester et al., 2015).

BPS u hlodavců indukuje růst dělohy, podobně jako estrogeny (Rochester et al., 2015). U ryb pak narušuje reprodukci díky změnám ve struktuře chromatinu a zvýšení výskytu apoptózy ve zralých folikulech (Santangeli et al., 2016). Také způsobuje významné snížení produkce oocytů a zvýšení estradiolu v plazmě samců i samic danií pruhovaných. U samců mimo to dochází k snížení koncentrace androgenů v krevní plazmě. Jsou také popisovány změny v expresi aromatázy, nezbytné pro syntézu estradiolu. Vystavení rodičovských párů ryb BPS vede k opožděnému a omezenému líhnutí, a to i uskutečňuje-li se v čisté vodě. Zvyšuje se také výskyt malformací embryí (Kyunghee et al., 2013).

4 Materiál a metody

Aspirace kumulo-oocytárních komplexů

Na jatkách v Českém Brodě a Příbrami byly získávány vaječníky prepubertálních prasnic, které se v termoizolační nádobě převezly do laboratoře za udržení fyziologické teploty 39°C. Aspirace folikulární tekutiny probíhala pomocí 10 ml injekčních stříkaček a 20G jehel z veškerých viditelných ovariálních folikulů.

Výběr meioticky kompetentních oocytů ve stadiu GV

Obsah injekční stříkačky s naaspirovanou folikulární tekutinou byl umístěn na nedělenou petriho misku. Pod binokulární lupou ve vyhřevném boxu ($t=39^{\circ}\text{C}$) s IF lampami byly identifikovány kumulo-oocytární komplexy a ty následně přeneseny do manipulačního media TL-HEPES-PVA. K tomu byly použity tenkostěnné skleněné kapiláry. V manipulačním mediu pak byly pod binokulární lupou vybírány meioticky kompetentní oocyty. Byla hodnocena vrstva kumulárních buněk, velikost oocytu a celistvost jeho cytoplazmy. K dalšímu použití byly vybírány oocyty s celistvou cytoplazmou a dostatečným počtem (vrstev) kumulárních buněk.

| SLOŽENÍ MANIPULAČNÍHO MEDIA TL-HEPES-PVA | |
|--|----------|
| Destilovaná voda | 1000 ml |
| NaCl | 6,6633 g |
| KCl | 0,2386 g |
| NaH ₂ PO ₄ | 0,0408 g |
| Na Lactate (L7900, Sigma-Aldrich) | 1,4 ml |
| MgCl ₂ · 6H ₂ O | 0,1017 g |
| HEPES | 2,3830 g |
| Na Pyruvate | 0,0220 g |
| Sorbitol | 2,1860 g |
| NaHCO ₃ | 0,1680 g |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 0,2940 g |
| Gentamicin (G1264, Sigma-Aldrich) | 0,0250 g |
| Penicillin G (PENK, Sigma-Aldrich) | 0,0650 g |
| PVA | 0,1000 g |

Složení kultivačních medií

Kultivace kumulo-oocytárních komplexů probíhala v modifikovaném médiu M199, obohaceném o 7% roztok hydrogenuhličitanu sodného, laktát vápenatý, pyruvát sodný, gentamicin, HEPES, eCG + hCG (P. G. 600) a 5% FCS. Pro experimentální skupiny oocytů byl do kultivačního média přidán BPS, ředěný na danou koncentraci (3 nM, 300 nM a 30 μ M) v DMSO.

| SLOŽENÍ KULTIVAČNÍHO MEDIA | |
|----------------------------|-----------|
| Medium 199 (Sigma-Aldrich) | 100 ml |
| Laktát vápenatý | 0,0600 g |
| Pyruvát sodný | 0,0250 g |
| HEPES | 0,1500 g |
| Gentamicin | 0,0025 g |
| 7% Hydrogenuhličitan sodný | 3,9000 ml |

Kultivace kumulo-oocytárních komplexů

Kumulo-oocytární komplexy byly od manipulačního media postupně proplachovány ve třech samostatných kapkách kultivačního média. Poté byly přeneseny do čtyřdůlkové kultivační misky s připraveným kultivačním médiem s P. G. 600 pro kontrolní skupinu a s P. G. 600 a požadovanými koncentracemi BPS pro skupiny experimentální. Takto ošetřené oocyty byly umístěny v inkubátoru (5 % CO₂, 39°C). Délka kultivace byla 24 hodin (tehdy prasečí oocyty běžně dosahují metafáze I) nebo 48 hodin (kdy prasečí oocyty obvykle dosahují metafáze II).

Odstranění kumulárních buněk expandovaných kumulo-oocytárních komplexů

Odstranění kumulárních buněk bylo uskutečňováno pomocí opakovaného nasávání kultivačního media s oocyty 200 μ l pipetou se zúženou špičkou. Tím bylo zajištěno téměř dokonalé odstranění kumulárních buněk. Zbylé kumulární buňky byly odstraněny kapilárou, jejíž průměr byl upilován na velikost oocytu. Kumulo-oocytární komplex byl do kapiláry opakovaně nasáván, čímž bylo dosaženo mechanického odstranění zbývajících kumulárních buněk.

Fixace a barvení oocytů

Oocyty byly následně umístěny na podložní sklo, za pomoci vazelíny překryty krycím sklem a minimálně 24 hodin fixovány v roztoku etanolu a kyseliny octové (poměr 1:3). Poté byly obarveny 1% orceinem.

Posuzování stadia zrání oocytů

Zrání oocytu bylo posuzováno pomocí fázového kontrastního mikroskopu při 400násobném zvětšení. Stadia jaderného zrání byla hodnocena podle dosažení různých fází meiózy, a to konkrétně GV, pozdní diakineze (LD), metafáze I, anafáze I, telofáze I a metafáze II, podle dříve popsaných kritérií (Motlik et al., 1986).

Statistické hodnocení

Získaná data jsou výsledkem čtyř nezávislých experimentů, ve kterých bylo pro každou sledovanou skupinu použito 120 oocytů. Statisticky byl z těchto čtyř experimentů vyhodnocen průměr a směrodatná odchylka počtu (%) oocytů v každé skupině podle fáze dozrání. Různé indexy označují statistickou významnost mezi experimentálními skupinami ve stejné fázi meiotického zrání.

5 Výsledky

5.1 Efekt BPS na meiotické zrání při 24hodinové kultivaci *in vitro*

Při *in vitro* kultivaci prasečích oocytů (GV) je po 24 hodinách obvyklé dosažení metafáze I. To se potvrdilo u 100 % kontrolních oocytů, kultivovaných bez BPS. Se zvyšující se koncentrací BPS docházelo ke snižování počtu oocytů, které byly schopné dosáhnout této fáze meiózy.

Při 3nM koncentraci BPS se do metafáze I dostalo průměrně 78,3 % oocytů ($\pm 2,2$ %). Zbýlých 21,7 % ($\pm 2,2$ %) dosáhlo pouze pozdní diakineze.

Při koncentraci 300 nM BPS nebylo 14,2 % ($\pm 1,6$ %) oocytů schopno obnovit meiotické zrání a i po 24 hodinách kultivace zůstalo ve stadiu zárodečného včku. 16,7 % ($\pm 1,9$ %) oocytů dosáhlo pozdní diakineze. Pouze 69,2 % ($\pm 2,8$ %) vykazovalo normální průběh zrání a dosáhlo metafáze I.

Při koncentraci 30 μ M BPS zůstalo ve stadiu zárodečného včku průměrně 17,5 % ($\pm 1,6$ %) oocytů, neschopných obnovit meiózy. Pozdní diakineze dosáhlo 19,2 % ($\pm 2,5$ %) oocytů. Metafáze I tedy dosáhlo jen 63,3 % ($\pm 3,0$ %) oocytů.

Výsledky naznačují, že v rámci oocytů, které po 24 hodinách kultivace zůstaly v GV stadiu (tedy neschopných obnovit meiotické zrání) není statisticky průkazný rozdíl mezi počtem kontrolních oocytů a oocytů, kultivovaných v 3nM koncentraci BPS. Statisticky průkazný rozdíl je však mezi kontrolními oocyty a oocyty, kultivovanými v 300nM koncentraci BPS i 30 μ M koncentraci BPS. Statisticky průkazný rozdíl je také mezi oocyty z 300nM a 30 μ M koncentrace BPS navzájem.

V dosahování pozdní diakineze není statisticky významný rozdíl mezi oocyty, kultivovanými v přítomnosti jakékoliv koncentrace BPS. Statisticky průkazný rozdíl však existuje mezi kontrolními oocyty a oocyty z každé koncentrace BPS.

Ohledně dosahování metafáze I existuje statisticky průkazný rozdíl mezi každou kombinací pozorovaných skupin (kontrola, 3nM, 300nM, 30 μ M).

| | GV | SEM | LD | SEM | MI | SEM |
|------------|-------------------|-----|--------------------|-----|-------------------|-----|
| C | 0 ^a | 0 | 0 ^I | 0 | 100 ¹ | 0 |
| 3 nM | 0 ^a | 0 | 21,7 ^{II} | 2,2 | 78,3 ² | 2,2 |
| 300 nM | 14,2 ^b | 1,6 | 16,7 ^{II} | 1,9 | 69,2 ³ | 2,8 |
| 30 μ M | 17,5 ^c | 1,6 | 19,2 ^{II} | 2,5 | 63,3 ⁴ | 3,0 |

Tabulka 1: Efekt BPS (3 nM, 300 nM, 30 μ M) na dosažení jednotlivých stadií meiotického zrání při 24hodinové kultivaci *in vitro*. GV – zárodečný váček (germinal vesicle), LD – pozdní diakineze (late diakinesis), MI – metafáze I. Data jsou vyjádřena v procentech jako průměr a příslušná směrodatná odchylka (SEM) ze 4 nezávislých experimentů, n = 120 oocytů pro každou skupinu. Odlišné superskripty vyjadřují statistickou významnost mezi experimentálními skupinami v rámci stejného stadia meiotického zrání.

5.2 Efekt BPS na meiotické zrání při 48hodinové kultivaci *in vitro*

Po 48 hodinách kultivace dosahují za normálních okolností prasečí oocyty metafáze II. Proto se 98,3 % ($\pm 1,0$ %) kontrolních oocytů, kultivovaných bez BPS, nacházelo v této fázi meiózy. Zbýlých 1,7 % ($\pm 1,0$ %) kontrolních oocytů dosáhlo i po 48 hodinách kultivace pouze metafáze I.

Při 3nM koncentraci BPS dosáhlo metafáze II a tedy normálního průběhu zrání 91,7 % ($\pm 1,7$ %) oocytů. 5,8 % ($\pm 1,6$ %) oocytů se nacházelo v metafázi I a 2,5 % ($\pm 1,6$ %) oocytů se dostalo do AI-TI.

Při koncentraci 300 nM BPS vykazovalo normální průběh zrání za dosažení metafáze II 86,7 % ($\pm 1,4$ %) oocytů. Zbývajících 13,3 % ($\pm 1,4$ %) oocytů dosáhlo pouze metafáze I.

Při koncentraci 30 μ M BPS dosáhlo požadované metafáze II pouze 63,3 % ($\pm 1,4$ %) oocytů. Zbýlých 36,7 % ($\pm 1,4$ %) oocytů se nacházelo v metafázi I.

V dosahování metafáze I po 48 hodinách IVM existuje statisticky významný rozdíl mezi libovolnou kombinací pozorovaných skupin oocytů (kontrola, 3nM, 300nM, 30 μ M).

Pokud jde o mírné zpomalení zrání a tedy dosažení AI-TI, neexistuje statisticky průkazný rozdíl mezi žádnou pozorovanou skupinou oocytů (kontrola, 3nM, 300nM, 30 μ M).

Statisticky významný rozdíl je však patrný mezi jakoukoliv kombinací pozorovaných skupin oocytů (kontrola, 3nM, 300nM, 30 μ M) při dosahování metafáze II.

| | MI | SEM | AI/TI | SEM | MII | SEM |
|------------|-------------------|-----|------------------|-----|-------------------|-----|
| C | 1,7 ^a | 1,0 | 0 ^I | 0 | 98,3 ¹ | 1,0 |
| 3 nM | 5,8 ^b | 1,6 | 2,5 ¹ | 1,6 | 91,7 ² | 1,7 |
| 300 nM | 13,3 ^c | 1,4 | 0 ^I | 0 | 86,7 ³ | 1,4 |
| 30 μ M | 36,7 ^d | 1,4 | 0 ^I | 0 | 63,3 ⁴ | 1,4 |

Tabulka 2: Efekt BPS (3 nM, 300 nM, 30 μ M) na dosažení jednotlivých stadií meiotického zrání při 48hodinové kultivaci *in vitro*. MI – metafáze I, AI/TI – přechod anafáze I/telofáze I, MII – metafáze II. Data jsou vyjádřena v procentech jako průměr a příslušná směrodatná odchylka (SEM) ze 4 nezávislých experimentů, n = 120 oocytů pro každou skupinu. Odlišné superskripty vyjadřují statistickou významnost mezi experimentálními skupinami v rámci stejného stadia meiotického zrání.

6 Diskuze

Cílem práce bylo vyhodnotit vliv BPS na zrání prasečích oocytů. Ovlivnění meiotického zrání bylo hodnoceno podle schopnosti oocytů dosáhnout různých stadií meiózy. Abychom prokázali, zda je narušen proces dosažení 1. meiotické metafáze, byly oocyty kultivovány do stádia MI. Stadia MI dosahovaly se sníženou účinností v závislosti na použité koncentraci BPS. Ačkoliv z výsledků tohoto experimentu vyplývá, že po 24 hodinách kultivace neměla koncentrace 3 nM BPS statisticky průkazný vliv na vystoupení oocytů z prvního meiotického bloku, vyšší koncentrace (300 nM a 30 μ M BPS) už statisticky průkazně snižovaly schopnost oocytů tento meiotický blok prolomit a znovu zahájit meiotické zrání. Avšak i podařilo-li se BPS-ošetřeným oocytům vystoupit z GV stádia, vykazovaly oproti kontrolním oocytům statisticky průkazné zvýšení výskytu narušeného zrání, kdy po 24 hodinách kultivace dosahovaly pouze stadia pozdní diakineze, a to v jakékoliv použité koncentraci BPS. Pozdní diakineze přitom prasečí oocyty běžně dosahují již po 20 hodinách kultivace (Kubelka et al., 1988). Přidání bisfenolu S do kultivačního media tedy mělo za následek narušený průběh meiotického zrání oocytů.

Jelikož neexistují podobné výzkumy, věnující se vlivu BPS na savčí oocyty, nabízí se srovnání s efektem BPA, který je v dnešní době považován za hrozbu pro lidské zdraví a z toho důvodu je BPS hojně nahrazován. Zároveň se jedná o strukturální analog BPA s prokázanou estrogení aktivitou (Rochester et al., 2015). Při studii na myších oocytech mělo kontinuální vystavení koncentraci 30 μ M BPA vliv na průběh meiózy I. Přibližně 20 % oocytů zůstalo po 18 hodinách od zahájení zrání ve stadiu zárodečného vajíčku, neschopno podstoupit GVBD. Při normálním průběhu meiózy se přitom myší oocyty po 18 hodinách zrání nachází v metafázi II. Nižší koncentrace BPA neměly na průběh meiózy významný vliv (Lenie et al., 2008). V jiné studii po 8 hodinách kultivace, kdy myší oocyty za normálních okolností dosahují metafáze I, ovlivňoval BPA meiózu v koncentraci 10 μ M a 30 μ M. V obou koncentracích BPA bylo dosahování MI redukováno o více než třetinu, přičemž vyšší koncentrace BPA jej ovlivňovala významněji. Rozpad zárodečného vajíčku však podstoupily všechny oocyty, ty, které nedosáhly MI, se nacházely v prometafázi (Can et al., 2005).

Aby bylo možné rozhodnout, zda BPS působí mechanismem nevratně poškozujícím profázi prvního meiotického dělení nebo výrazně zpozdujícím buněčný cyklus, byly oocyty kultivovány 48 hodin v přítomnosti BPS. Všechny oocyty dosáhly stádia MI, buněčný cyklus tedy nebyl účinkem BPS v profázi zastaven, ale spíše významně opožděn. Část oocytů již nedokázala pokračovat v meióze a dosáhnout stádia MII, a to opět v závislosti na použité

koncentraci BPS. Zastavení meiózy v MI vykazovalo tím více oocytů, čím vyšší koncentrace BPS byla při jejich kultivaci použita. Při koncentraci 30 μM BPS po 48 hodinách kultivace zůstalo téměř 40 % oocytů v metafázi I. Nenarušeného průběhu zrání a tedy metafáze II v našem experimentu dosahovalo po 48 hodinách kultivace opět tím méně oocytů, čím vyšší koncentrace BPS byla použita při jejich kultivaci. Při použití nejvyšší (30 μM) koncentrace BPS to bylo pouhých 63 % z nich (oproti kontrolním oocytům s 98% úspěšností dosažení MII). Ve skupině oocytů, které byly kultivovány při koncentraci 3 nM BPS, dosáhla necelá 3 % oocytů pouze AI/TI, kterého je u prasečích oocytů běžně dosahováno během 32 hodin kultivace (Motlik et al., 1986). Nejde však o statisticky významné množství oocytů.

Jde-li o zrání oocytů do metafáze II, studií, popisujících jeho průběh při expozici BPA je více, jelikož většina z nich se zaměřuje na vyhodnocení zrání oocytů až po jeho očekávaném dokončení. U prasečích oocytů se jedná o 40-48 hodin kultivace (Motlik et al., 1986), u myších oocytů trvá zrání oocytů do MII 18 hodin (Can et al., 2005), u lidských oocytů jde o 30hodinovou kultivaci *in vitro* (Machtinger et al., 2013).

V experimentu na prasečích oocytech kultivovaných 44 hodin při koncentraci 200 a 250 μM BPA docházelo oproti kontrole k signifikantnímu snížení počtu oocytů s vyděleným pólovým tělískem. Většina BPA-ošetřených oocytů se nacházela v MI nebo AI/TI. Také bylo významně sníženo dosahování metafáze II (Wang et al., 2016). Také další studie potvrdila narušení jaderného zrání pod vlivem BPA. Při koncentraci 100 μM BPA dosahovala metafáze II pouze polovina oocytů, kultivovaných ve spojení s kumulárními buňkami. GVBD v takovém případě podstupilo necelých 80 % oocytů. Při kultivaci oocytů bez přítomnosti kumulárních buněk byl pak vliv 100 μM BPA výraznější a MII dosahovala pouze necelá čtvrtina oocytů. U denudovaných kontrolních oocytů, kultivovaných bez přítomnosti BPA, byla přitom úspěšnost dosažení MII 65 % (Mlynářčíková et al., 2009).

U *in vitro* kultivovaných lidských oocytů bylo po ošetření BPA o koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$ prokázáno významné snížení dosahování metafáze II. Při vyšší koncentraci BPA docházelo k ubývání množství oocytů, schopných dosáhnout MII a vzrůstalo množství degenerovaných oocytů (Machtinger et al., 2013).

U myších oocytů byl zkoumán vliv kontinuální expozice BPA o koncentraci od 3 nM do 30 μM . Jednalo se o 12denní kultivaci folikulů v přítomnosti BPA s následnou *in vitro* ovulací a hodnocením oogeneze 18 hodin po této ovulaci. V důsledku docházelo se vzrůstající koncentrací BPA k snížení množství oocytů, které byly schopné vydělení pólového tělíska. Při koncentraci 30 μM BPA vydělila pólové tělísko méně než polovina oocytů, čtvrtina oocytů zůstala v metafázi I (Lenie et al., 2008). V jiné studii bylo při koncentraci BPA

10 µg/ml významně zvýšené množství myších oocytů, které, ač prodělaly GVBD, nebyly schopné vydělit pólóvé tělísko (Eichenlaub-Ritter, 2008). V jiném experimentu oocyty vystavené koncentraci BPA nižší, než 100 µM přežívaly a vydělily pólóvé tělísko, při překročení koncentrace 1 mM BPA byl pozorován jeho cytotoxický efekt, kdy například docházelo ke zvýšení hladiny vápníkových kationtů v cytoplazmě, což vedlo k navození apoptózy (Mohri et Yoshida, 2005).

Podobné působení BPA a BPS není náhodné, jelikož jde o strukturní analogy (Danzl et al., 2009). Porovnání vlivu BPA a BPS v rámci jedné studie bylo provedeno na háďátku *Caenorhabditis Elegans*, což je kanonický modelový organismus pro studium diferenciacie zárodečných buněk. U těchto hermafroditů docházelo pod vlivem obou bisfenolů k snížení četnosti potomstva z důvodu nárůstu embryonální mortality. Při použití 500 µM bisfenolu docházelo u BPA-ošetřených háďátek k třikrát vyšší letalitě embryí, při použití BPS byla embryonální letalita oproti kontrole dokonce pětikrát vyšší. Při použití směsi BPA a BPS byla letalita oproti kontrole téměř pětikrát zvýšena. Při vývoji zárodečných buněk docházelo v pachytenním stadiu k ztrátě jejich jader. Ta se častěji projevovala pod vlivem BPA, kdy k ní docházelo u více, než 40 % sledovaných jedinců. Za přítomnosti BPS nebo kombinace BPA a BPS se tato ztráta jader projevovala u přibližně třetiny jedinců. Přitom se nacházela pouze u 10 % kontrolních jedinců. Pod vlivem bisfenolů byla pozorována také zvýšená apoptóza zárodečných buněk. V přítomnosti BPA, BPS i jejich kombinaci docházelo častěji k silné fosforylaci CHK-1, což je kontrolní protein meiózy, aktivující se v odpovědi na aberantní meiotickou rekombinaci, konkrétně v případě jedno- nebo dvouvláknových zlomů DNA, který je schopen spustit apoptózu (Chen et al., 2016).

Mechanismus účinku BPA na narušení meiotického zrání byl již podroben několika studiím. Jejich výsledky se shodují v pozorování narušené stavby dělicích vřetének a v důsledku toho nahodilého uspořádání chromozomů (Eichenlaub-Ritter et al., 2008; Lenie et al., 2008; Machtinger et al., 2013; Wang et al., 2016). BPA ovlivňoval centrozomální proteiny a v menší míře také mikrotubuly, což vedlo k tvorbě abnormálních dělicích vřetének a chybnému rozestupu chromozomů v rámci meiózy (Can et al., 2005). Měl vliv na rozmístění pericentrinu, který byl spíše než na pólech dělicího vřetena uspořádán na několika oddělených místech v rámci celého dělicího vřeténka, někdy též v cytoplazmě oocyty. BPA tedy ovlivňoval integritu centrozomálního materiálu (Eichenlaub-Ritter et al., 2008). Typickým regulátorem funkce dělicího vřeténka je MAPK, jejíž exprese byla pod vlivem BPA významně snížena (Wang et al., 2016), což může průběh meiózy zásadně ovlivňovat. Po ošetření BPA byla také pozorována snížená exprese membránového a cytoskeletálního

aktinu, které jsou nezbytné pro cytokinezi a vydělení pólového tělíska. To mělo vliv na neschopnost oocytů vydělit pólová tělíska (Wang et al., 2016). Byla pozorována také zvýšená polyploidie, když oocyty vstoupily do anafáze I bez tvorby pólového tělíska (Eichenlaub-Ritter et al., 2008). Dále docházelo ke změně exprese různých DNA methyltransferáz, což může vyústit v epigenetické poruchy či narušit meiotickou progresi oocytů (Wang et al., 2016).

Například zmíněné abnormality dělicího vřetena a neuspořádaných chromozomů by se u myších oocytů v MII mohly častěji projevovat při vystavení nižším koncentracím BPA. Při výzkumu vlivu 3 nM – 30 μ M koncentrací BPA byl v MII při nejnižší koncentraci BPA pozorován nejvyšší výskyt nahodile uspořádaných chromozomů, které byly rozptýlené po celém dělicím vřetenu. Při nižších koncentracích bylo však vyšší procento oocytů schopno projít meiózou až do MII. Při použití vyšších koncentrací BPA pak častěji docházelo k zastavení buněčného cyklu v MI. Pokud oocyt dospěl do MII, míval více či méně neuspořádané chromozomy. Vážnost narušení dělicího vřetena byla závislá na použité koncentraci BPA a byla určující pro navození kontrolního bodu MI (Lenie et al., 2008), který oddaluje nástup anafáze, dokud nejsou všechny chromozomy správně seřazeny a připojeny k mikrotubulům dělicího vřeténka (Brunet et al., 2003). Oocyty vystavené nízkým dávkám BPA byly schopné obejít tento kontrolní bod a dostat se do metafáze II. Takové oocyty však nebyly kvalitní a po oplodnění by mohly dát základ chromozomálně abnormálním embryím (Lenie et al., 2008). Ačkoliv Hunt et al. (2003) pozoroval u myších oocytů náhodně vystavených vlivu BPA zvýšený výskyt aneuploidie (Hunt et al., 2003), je známa i studie, v níž se ani při nejvyšší použité koncentraci 10 μ g/ml BPA u myších oocytů ve významně zvýšené míře aneuploidie nevyskytovala (Eichenlaub-Ritter et al., 2008).

Z našich výsledků vyplývá, že BPS negativně ovlivňuje průběh meiotického zrání. Jeho vliv se přitom dá přirovnat k působení BPA, jehož použití v dnešní době čelí omezování a zákazům z důvodu nepříznivého vlivu na lidské zdraví. Také z výsledků dostupných studií se zdá, že BPS není bezpečnou náhradou za BPA. Do budoucna se dá očekávat ověření nepříznivých efektů BPS také na lidských oocytech. Vzhledem k podobnému průběhu oogeneze jako u oocytů prasečích a doložených negativních efektů BPA jakožto strukturně podobné molekuly se zdá pravděpodobné, že ani lidské oocyty nebudou nepříznivého působení BPS ušetřeny.

7 Závěr

Cílem této práce bylo ověření hypotézy, že bisfenol S negativně ovlivňuje průběh meiotického zrání prasečích oocytů. BPS skutečně významně ovlivňoval průběh meiózy. Žádná z použitých koncentrací BPS nezůstala bez nepříznivého efektu na zrání oocytů. Závažnost efektů byla závislá na použité koncentraci BPS.

Metafáze I dosahovalo po 24 hodinách tím méně oocytů, čím vyšší koncentrace BPS byla při jejich kultivaci použita. Při 48hodinové kultivaci oocytů však metafáze I dosáhly všechny oocyty bez závislosti na použité koncentraci BPS. BPS tak zřejmě nenarušuje, ale pouze významně opoždí průběh profáze meiózy I. Metafáze II po 48 hodinách kultivace dosáhlo opět tím méně oocytů, čím vyšší koncentrace BPS byla při jejich kultivaci použita.

Problémem u endokrinních disruptorů zůstává nemotónní závislost závažnosti efektů na koncentraci působící disruptivní látky, kdy její nízké koncentrace mohou způsobovat silnější efekty, než koncentrace vysoké. Určení bezpečné koncentrace takové látky je velmi problematické. I nejnižší koncentrace BPS, použitá v našem experimentu, způsobovala významné omezení zrání oocytů.

Z uvedených skutečností vyplývá, že BPS zřejmě nebude tou nejvhodnější náhradou za BPA, kterému se v mnohém podobá. Jeho použití ve výrobcích lidské denní potřeby je ošidné, prozatím však také nezbytné. Expozice BPA nebo BPS je v dnešní době nevyhnutelná, z toho důvodu je nutné upozorňovat na jejich nepříznivé efekty a snažit se najít vhodnější alternativu.

8 Seznam literatury

- Adhikari, D., Liu, K., Kaldis, P. 2015. Mastl/PP2A regulate Cdk1 in oocyte maturation. *Oncotarget*. 6 (22). 18734 - 18735.
- Assey, R. J., Hyttel, P., Greve, T., Purwantara, B. 1994. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Molecular reproduction and development*. 37 (3). 335 - 344.
- Brevini, T. A. L., Vassena, R., Francisci, C., Gandolfi, F. 2005. Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes. *Biology of reproduction*. 72. 1218 - 1223.
- Briño-Enríquez, M. A., Robles, P., Camats-Tarruella, N., García-Cruz, R., Roig, I., Cabero, L., Martínez, F., Garcia Caldéz, M. 2011. Human meiotic progression and recombination are affected by Bisphenol A exposure during *in vitro* human oocyte development. *Human reproduction*. 26 (10). 2807 - 2818.
- Brunet, S., Pahlavan, G., Taylor, S., Maro, B. 2003. Functionality of the spindle checkpoint during the first meiotic division of mammalian oocytes. *Reproduction*. 126. 443 - 450.
- Bukovsky, A., Claudle, M. R., Svetlikova, M., Wimalasena, J., Ayala, M. E., Domingues, R. 2005. Oogenesis in adult mammals, including humans: A review. *Endocrine*. 26 (3). 301 - 316.
- Byskov, A. G., Skakkebaek, N. E., Stafanger, G., Peters, H. 1977. Influence of ovarian surface epithelium and rete ovarii on follicle formation. *Journal of anatomy*. 123. 77 - 86.
- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L., Reidy, J. A., Needham, L. L. 2008. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environmental health perspectives*. 116 (1). 39 - 44.

Can, A., Semiz, O., Cinar, O. 2005. Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. *Molecular human reproduction*. 11 (6). 389 - 396.

Cano-Nicolau, J., Vaillant, C., Pellegrini, E., Charlier, T. D., Kah, O., Coumailleau, P. 2016. Estrogenic effects of several BPA analogs in the developing zebrafish brain. *Frontiers in neuroscience*. 10. 112. DOI: 10.3389/fnins.2016.00112.

Chen, Y., Shu, L., Qiu, Z., Lee, D. Y., Settle, S. J., Hee, S. Q., Telesca, D., Yang, X., Allard, P. 2016. Exposure to BPA-substitute bisphenol S causes unique alterations of germline function. *PLoS Genetics*. 12 (7). DOI: 10.1371/journal.pgen.1006223.

Corrales, J., Kristofco, L. A., Baylor Steele, W., Yates, B. S., Breed, C. S., Williams, E. S., Brooks, B. W. 2015. Global assessment of bisphenol A in the environment: Review and analysis of its occurrence and bioaccumulation. *Dose response*. 13 (3). DOI: 10.1177/1559325815598308.

Coticchio, G., Albertini, D. F., De Santis, L. (eds.). 2013. *Oogenesis*. Springer-Verlag London. London. 364 s. ISBN 978-0-85729-826-3.

Cran, D. G. 1985. Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *Journal of reproduction and fertility*. 74. 237 - 245.

Danzl, E., Kazunari, S., Satoshi, S., Michihiko, I., Masanori, F. 2009. Biodegradation of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S in seawater. *International journal of environmental research and public health*. 6 (4). 1472 - 1484.

David, G. F. X., Anand Kumar, T. C., Baker, T. G. 1974. Uptake of tritiated thymidine by primordial germinal cells in the ovaries of the adult slender loris. *Journal of reproduction and fertility*. 41. 447 - 451.

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, T., Gore, A. C. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine society scientific statement. *Endocrine reviews*. 30(4). 293 - 342.

- Ding, W., Wang, W., Zhou, B., Zhang, W., Huang, P., Shi, F., Taya, K. 2010. Formation of primordial follicles and immunolocalization of PTEN, PKB and FOXO3A proteins in the ovaries of fetal and neonatal pigs. *Journal of reproduction and development*. 56 (1). 162 - 168.
- Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N., Matzuk, M. M. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*. 383 (6600). 531 - 535.
- Driancourt, M. A., Reynaud, K., Cortvrindt, R., Smitz, J. 2000. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Reviews of reproduction*. 5 (3). 143 - 152.
- Duke, K. L. 1967. Ovogenetic activity of the fetal-type in the ovary of the adult slow-loris, *Nycticebus coucang*. *Folia primatologica*. 7. 150 - 154.
- Dunbar, B. S., Wardrip, N. J., Hedrick, J. L. 1980. Isolation, physicochemical properties, and macromolecular composition of *zona pellucida* from porcine oocytes. *Biochemistry*. 19 (2). 356 - 365.
- Dupré, A., Buffin, E., Roustan, C., Nairn, A. C., Jesus, C., Haccard, O. 2013. The phosphorylation of ARPP19 by Greatwall renders the auto-amplification of MPF independently of PKA in *Xenopus* oocytes. *Journal of cell science*. 126. 3916 - 3926.
- Durlinger, A. L. L., Visser, J. A., Themmen, A. P. N. 2002. Regulation of ovarian function: The role of anti-mullerian hormone. *Reproduction*. 124. 601 - 609.
- Ebeling, S., Schuon, C., Meinecke, B. 2007. Mitogen-activated protein kinase phosphorylation patterns in pig oocytes and cumulus cells during gonadotrophin-induced resumption of meiosis *in vitro*. *Zygote*. 15 (2). 139 - 147.
- Eichenlaub-Ritter, U., Vogt, E., Cukurcam, S., Sun, F., Pacchierotti, F., Parry, J. 2008. Exposure of mouse oocytes to bisphenol A causes meiotic arrest but not aneuploidy. *Mutation research*. 651. 82 - 92.

- Eppig, J. J. 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reproduction, fertility and development*. 8 (4). 485 - 489.
- Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal reproduction science*. 78. 203 - 216.
- Familiari, G., Heyn, R., Relucenti, M., Sathanathan, H. 2008. Structural changes of the *zona pellucida* during fertilization and embryo development. *Frontiers in bioscience*. 13 (17). 6730 - 6751.
- Fan, H. Y., Huo, L. J., Meng, X. Q., Zhong, Z. S., Hou, Y., Chen, D. Y., Sun, Q. Y. 2003a. Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in meiotic maturation and activation of pig oocytes. *Biology of reproduction*. 69 (5). 1552 - 1564.
- Fan, H. Y., Tong, C., Lian, L., Li, S. W., Gao, W. X., Cheng, Y., Chen, D. Y., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2003b. Characterization of ribosomal S6 protein kinase p90rsk during meiotic maturation and fertilization in pig oocytes: Mitogen-activated protein kinase-associated activation and localization. *Biology of reproduction*. 68 (3). 968 - 977.
- Ferris, J., Favetta, L. A., Allan King, W. 2015. Bisphenol A exposure during oocyte maturation *in vitro* results in spindle abnormalities and chromosome misalignment in *Bos taurus*. *Cytogenetic and genome research*. DOI: 10.1159/000381321.
- Foxcroft, G. R., Hunter, M. G. 1985. Basic physiology of follicular maturation in the pig. *Journal of reproduction and fertility supplement*. 33. 1 - 19.
- Fulka Jr, 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 edition. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts. 695 p. ISBN: 0-87893-243-7. Dostupný také z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9983/>>.

Graselli, F., Ponderato, N., Basini, G., Tamanini, C. 2001. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide/cyclic GMP pathway in swine granulosa cells. *Domestic animal endocrinology*. 20. 241 - 252.

Hirao, Y., Nagai, T., Kubo, M., Miyano, T., Miyake, M., Kato, S. 1994. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *Journal of reproduction and fertility*. 100. 333 - 339.

Howdeshell, K. L., Peterman, P. H., Judy, B. M., Taylor, J. A., Orazio, C. E., Ruhlen, R. L., Vom Saal, F. S., Welshons, W. V. 2003. Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environmental health perspectives*. 111 (9). 1180 - 1187.

Hunt, P., Koehler, K. E., Susiarjo, M., Hodges, C. A., Ilagan, A., Voigt, R. C., Thomas, S., Thomas, B. F., Hassold, T. J. 2003. Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Current biology*. 13. 546 - 553.

Irie, N., Tang, W. W. C., Surani, M. A. 2014. Germ cell specification and pluripotency in mammals: A perspective from early embryogenesis. *Reproductive medicine and biology*. 13 (4). 203 - 215.

Ioannou, J. M. 1964. Oogenesis in the guinea-pig. *Journal of embryology and experimental morphology*. 12 (4). 673 - 691.

Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H. J., Adams, G. B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*. 122 (2). 303 - 315.

Jones, K. T. 2008. Meiosis in oocytes: Predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Human reproduction update*. 14 (2). 143 - 158.

- Kikuchi, K., Naito, K., Noguchi, J., Kaneko, H., Tojo, H. 2002. Maturation/M-phase promoting factor regulates aging of porcine oocytes matured *in vitro*. Cloning stem cells. 4 (3). 211 - 222.
- Kochukov, M. Y., Jeng, Y., Watson, C. S. 2009. Alkylphenol xenoestrogens with varying carbon chain lengths differentially and potently activate signaling and functional responses in GH₃/B₆/F10 somatomammotropes. Environmental health perspectives. 117 (5). 723 - 730.
- Kubelka, M., Motík, J., Fulka Jr., J., Procházka, R., Rimkevicová, Z., Fulka, J. 1988. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and P-aminobenzamidine block. Gamete research. 19 (4). 423 - 431.
- Kurian, J. R., Keen, K. L., Kenealy, B. P., Garcia, J. P., Hedman, C. J., Terasava, E. 2015. Acute influences of bisphenol A exposure on hypothalamic release of gonadotropin-releasing hormone and kisspeptin in female rhesus monkeys. Endocrinology. 156 (7). 2563 - 2570.
- Krishnan, A. V., Stathis, P., Permuth, S. F., Tokes, L., Feldman, D. 1993. Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. Endocrinology. 132 (6). 2279 - 2286.
- Kyunghee, J., Hong, S., Kho, Y., Choi, K. 2013. Effects of bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. Environmental science and technology. 47 (15). 8793 - 8800.
- Lee, J., Miyano, T., Moor, R. M. 2000. Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. Zygote. 8 (2). 119 - 125.
- Lee, W. S., Otsuka, F., Moore, R. K., Shimasaki, S. 2001. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. Biology of reproduction. 64 (4). 994 - 999.

- Lenie, S., Cortvrindt, R., Eichenlaub-Ritter, U., Smitz, J. 2008. Continuous exposure to bisphenol A during *in vitro* follicular development induces meiotic abnormalities. *Mutation research*. 651. 71 - 81.
- Li, Q., Davila, J., Kannan, A., Flaws, J. A., Bagchi, M. K., Bagchi, I. C. 2016. Chronic exposure to bisphenol A affects uterine function during early pregnancy in mice. *Endocrinology*. 157 (5). 1764 - 1774.
- Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Loi, V. D., Mohd, M. A., Moon, H., Nakata, H., Kannan, K. 2012a. Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: Occurrence and human exposures. *Environmental science and technology*. 46 (12). 6860 - 6866.
- Liao, C., Liu, F., Kannan, K. 2012b. Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues. *Environmental science and technology*. 46 (12). 6515 - 6522.
- Machtinger, R., Combelles, C. M. H., Missmer, S. A., Correia, K. F., Williams, P., Hauser, R., Racowsky, C. 2013. Bisphenol-A and human oocyte maturation *in vitro*. *Human reproduction*. 28 (10). 2735 - 2745.
- Mahrous, E., Yang, Q., Clark, H. J. 2012. Regulation of mitochondrial DNA accumulation during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *Reproduction*. 144 (2). 177 - 185.
- Maserejian, N. N., Trachtenberg, F. L., Wheaton, O. B., Calafat, A. M., Ranganathan, G., Kim, H. Y., Hauser, R. 2016. Changes in urinary bisphenol A concentrations associated with placement of dental composite restorations in children and adolescents. *Journal of american dental association*. 147 (8). 620 - 630.
- McNatty, K. P., Heath, D. A., Lundy, T., Fidler, A. E., Quirke, L., O'Connell, A., Smith, P., Groome, N., Tisdall, D. J. 1999. Control of early ovarian follicular development. *Journal of reproduction and fertility supplement*. 54. 3 - 16.

Mileva, G., Baker, S. L., Konkle, A. T. M., Bielajew, C. 2014. Bisphenol-A: Epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior. *International journal of environmental research and public health*. 11 (7). 7537 - 7561.

Miyano, T., Dai, Y., Lee, J., Kano, K., Moor, R. M. 2000. Degradation of pig cyclin B1 molecules precedes MAP kinase dephosphorylation during fertilisation of the oocytes. *Zygote*. 8 (2). 153 - 158.

Miyano, T., Lee, J., Fulka Jr., J. 2003. G2/M transition of pig oocytes: How do oocytes initiate maturation? *Reproductive medicine and biology*. 2. 91 - 99.

Mohri, T., Yoshida, S. 2005. Estrogen and bisphenol A disrupt spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in mouse oocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 326. 166 - 173.

Motlik, J., Fulka, J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. 25 (1). 87 - 96.

Motlik, J., Fulka, J., Flechon, J. E. 1986. Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation *in vivo* and *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility*. 76 (1). 31 - 37.

Mlynářčiková, A., Nagyová, E., Ficková, M., Scsuková, 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.

NIEHS. National institute of environmental health sciences. Endocrine disruptors [online]. Alexandre Drive. Research Triangle Park. N. C. 27709. January 05 2017. [cit. 2017-10-01]. Dostupné z < <http://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/>>.

- Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V. O., Jaffe, L. A. 2009. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*. 136. 1869 - 1878.
- Patel, S., Zhou, C., Rattan, S., Flaws, J. A. 2015. Effects of endocrine-disrupting chemicals on the ovary. *Biology of reproduction*. 93 (1). 1 - 9.
- Peters, H. 1969. The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta endocrinologica*. 62. 98 - 116.
- Picton, H. M., Harris, S. E., Muruvi, W., Chambers, E. L. 2008. The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction*. 136. 703 - 715.
- Pincus, G., Enzmann, E. V. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *Journal of experimental medicine*. 62 (5). 665 - 675.
- Rath, D., Töpfer-Petersen, E., Michelmann, H. W., Schwartz, P., von Witzendorff, D., Ebeling, S., Ekhlasi-Hundrieser, M., Piehler, E., Petrunkina, A., Romar, R. 2006. Structural, biochemical and functional aspects of sperm-oocyte interactions in pigs. *Society of reproduction and fertility supplement*. 62. 317 - 330.
- Rezg, R., El-Fazaa, S., Gharbi, N., Mornagui, B. 2014. Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environment international*. 64. 83 - 90.
- Richardson, M. C., Guo, M., Fauser, B. C. J. M., Macklon, N. S. 2014. Environmental and developmental origins of ovarian reserve. *Human reproduction update*. 20 (3). 353 - 369.
- Richter, C. A., Birnbaum, L. S., Farabollini, F., Newbold, R. R., Rubin, B. S., Talsness, C. E., Vanderbergh, J. G., Walser-Kuntz, D. R., Saal, F. S. 2007. *In vivo* effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive toxicology*. 24 (2). 199 - 224.

Rochester, J. R., Bolden, A. L. 2015. Bisphenol S and F: A systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. *Environmental health perspectives*. 123 (7). 643 - 650.

Santangeli, S., Maradonna, F., Gioacchini, G., Cobellis, G., Piccinetti, C. C., Valle, L. D., Carnevali, O. 2016. BPA-induced deregulation of epigenetic patterns: Effects on female zebrafish reproduction. *Scientific reports*. 6:21982. DOI: 10.1038/srep21982.

Schwarz, T., Kopyra, M., Nowicki, J. 2008. Physiological mechanisms of ovarian follicular growth in pigs - a review. *Acta Veterinaria hungarica*. 56 (3). 369 - 378.

Shourbagy, S. H. E., Spikings, E. C., Freitas, M., John, J. C. S. 2006. Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction*. 131. 233 - 245.

Snustad, D. P., Simmons, M. J. 2009. *Genetika*. Nakladatelství Masarykovy Univerzity. Brno. 894 s. ISBN 978-80-210-4852-2.

Soto, A. M., Sonnenschein, C. 2010. Environmental causes of cancer: Endocrine disruptors as carcinogens. *Nature reviews endocrinology*. 6 (7). 363 - 370.

Sun, Q., Nagai, T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of reproduction and development*. 49 (5). 347 - 359.

Sun, Q. Y., Wu, G. M., Lai, L., Park, K. W., Cabot, R., Cheong, H. T., Day, B. N., Prather, R. S., Schatten, H. 2001. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. *Reproduction*. 122. 155 - 163.

Susiarjo, M., Hassold, T. J., Freeman, E., Hunt, P. A. 2007. Bisphenol A exposure *in utero* disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genetics*. 3 (1). 63 - 70.

Takagi, Y., Talbot, N. C., Rexroad Jr., C. E., Pursel, V. G. 1997. Identification of pig primordial germ cells by immunocytochemistry and lectin binding. *Molecular reproduction and development*. 46 (4). 567 - 580.

Talbot, P., Dandekar, P. 2003. Perivitelline space: Does it play a role in blocking polyspermy in mammals? *Microscopy research and technique*. 61 (4). 349 - 357.

Tilly, J. L. 2001. Commuting the death sentence: How oocytes strive to survive. *Nature reviews molecular cell biology*. 2 (11). 838 - 848.

Usman, A., Ahmad, M. 2016. From BPA to its analogues: Is it a safe journey? *Chemosphere*. 158. 131 - 142.

Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs Jr., D. R., Lee, D. H., Shioda, T., Soto, A. M., Vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., Myers, J. P. 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews*. 33 (3). 378 - 455.

Von Zastrow, M., Kobilka, B. K. 1994. Antagonist-dependent and antagonist-independent steps in the mechanism of adrenergic-receptor internalization. *Journal of biological chemistry*. 269 (28). 18448 - 18452.

Wang, T., Han, J., Duan, X., Xiong, B., Cui, X., Kim, N., Liu, H., Sun, S. 2016. The toxic effects and possible mechanisms of bisphenol A on oocyte maturation of porcine *in vitro*. *Oncotarget*. 7 (22). 32554 - 32565.

Watson, C. S., Jeng, Y., Kochukov, M. Y. 2010. Nongenomic signaling pathways of estrogen toxicity. *Toxicological sciences*. 115 (1). 1 - 11.

Wehrend, A., Meinecke, B. 1998. The meiotic cell cycle in oocytes of domestic animals. *Reproduction in domestic animals*. 33. 289 - 297.

WHO. World Health Organization. Endocrine disrupting chemicals (EDCs) [online]. WHO 2016. [cit. 2016-22-12]. Dostupné z: <<http://www.who.int/ceh/risks/cehemerging2/en/>>.

Yokoo, M., Miyahayashi, Y., Naganuma, T., Kimura, N., Sasada, H., Sato, E. 2002. Identification of hyaluronic acid-binding proteins and their expressions in porcine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation. *Biology of reproduction*. 67. 1165 - 1171.

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

Zhang, W., Yang, Y., Liu, W., Chen, Q., Wang, H., Wang, X., Zhang, Y., Zhang, M., Xia, G. 2015. Brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide maintain porcine oocyte meiotic arrest. *Journal of cellular physiology*. 230 (1). 71 - 81.

Zhao, X., Yu, D., Feng, C., Deng, X., Wu, D., Jin, M., Wang, E., Wang, X., Yu, B. 2014. Role of Greatwall kinase in release of mouse oocytes from diplotene arrest. *Development, growth and differentiation*. 56 (9). 669 - 678.