

Czech University of Life Sciences Prague  
Faculty of Agrobiological Sciences, Food and Natural Resources  
Department of Veterinary Sciences



**Influence of bisphenol S on quality of mouse oocytes  
and embryos**

Diploma Thesis

**Bc. Eliška Koutná**

**Thesis supervisor: prof. Ing. Jaroslav Petr, DrSc.**

**Thesis consultant: Ing. Jan Nevoral, Ph.D.**

# Vliv bisfenolu S na kvalitu myších oocytů a embryí

## Rozšířený souhrn:

Endokrinní disruptory jsou přírodní i syntetické chemické látky, které napodobují účinky nebo působí proti účinkům endogenních hormonů, a zasahují tak do hormonální regulace organismu. Důsledkem takového ovlivnění homeostázy pak mohou být i poruchy vývoje a reprodukce, které se týkají nejen jedinců přímo vystavených působení konkrétní látky, ale i jejich potomků skrze transgenerační dědičnost získaného epigenetického vzoru. Endokrinní disruptory jsou vzhledem k vysoké afinitě k hormonálním receptorům zpravidla účinné ve velmi malých dávkách a jejich závislost na dávce bývá nelineární a nemonotónní. Endokrinně-disrupční efekt vyvolává množství chemikálií přítomných v prostředí, jako jsou insekticidy, herbicidy nebo fungicidy, průmyslové chemikálie (PCB, PBB), fytoestrogeny nebo složky umělých hmot a epoxydových pryskyřic. V posledních dvou případech je takovou chemickou látkou bisfenol A (BPA), jehož negativní účinky na organismus savců v dávkách řádově nižších než nejvyšší stanovená referenční denní dávka ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{den}^{-1}$ ) byly již popsány a zahrnují například výrazné postižení procesu meiotického zrání, vznik aneuploidií nebo pozměněné epigenetické pozadí oocytu. Výsledkem je regulované používání BPA v např. dětských lahvích a tak je dnes mnoho dalších plastů tzv. BPA-free. V praxi byl ale BPA nahrazen svým strukturním analogem bisfenolem S (BPS), jehož účinky na savčí reprodukci nejsou dosud přesně definovány, a vědeckých prací, které se věnují této problematice, je stále velmi málo. BPS byl do této doby detekován v různých složkách prostředí, předmětech denní potřeby i balených potravinách, přičemž dosud provedené studie na modelových organismech naznačují podobné výsledky jako u BPA. Cílem této práce bylo ověřit hypotézu, že *in vivo* expozice velmi nízkým dávkám BPS postihuje negenomické a epigenetické kvalitativní vlastnosti myších oocytů, dvoubuněčných embryí a časných blastocyst.

Pětítýdenní samice myši kmene ICR byly po čtyři týdny vystaveny čtyřem různým koncentracím BPS (0; 0.001; 0.1; 10; 100 ng . g ž. hm.<sup>-1</sup> . den<sup>-1</sup>), které byly ale nižší a zároveň zahrnovaly EFSA a NIH stanovené limity pro BPA. Kumulo-oocytární komplexy byly izolovány 16 hodin po hormonální stimulaci eCG a hCG a získané oocyty byly použity pro další experimenty. Dvoubuněčná embrya byla vypláchnuta z oviduktu hormonálně stimulovaných myši 1,5 dne po přirozeném zapuštění a blastocysty byly vypláchnuty z dělohy 4,5 dne po přirozeném zapuštění. K visualizaci  $\alpha$ -tubulinu meiotického vřetene, pericentrinu, 5-metylcytosinu a specifických histonových modifikací (H3K4me2, H3K9me3, H3K27me2, ubH2A,  $\gamma$ H2AX, HP1) bylo použito imunocytochemické barvení a konfokální mikroskop se spinning diskem (Olympus, Německo). Intenzita fluorescenčního signálu byla kvantifikována v programu pro analýzu obrazu (ImageJ, NIH) a data byla statisticky vyhodnocena pomocí ANOVA a t-testu, přičemž hodnota signifikance  $\alpha = 0.05$  (MS Excel).

Výsledky prokázaly významné poškození struktury meiotického vřetene v MII zralých oocytech po expozici BPS, poškození tvaru dělicího vřetene a připojení mikrotubulů k jednotlivým chromosomům, které nebyly korektně zarovnané v ekvatoriální rovině. Tento efekt byl podpořen i změnami v detekci pericentrinu ve vřeteni. Signifikantní rozdíly byly detekovány mezi hodnotami DNA metylace u oocytů a dvoubuněčných embryí, kde došlo k výraznému snížení DNA metylace oproti kontrolní skupině při BPS koncentraci 0.1 ng . g ž. hm.<sup>-1</sup> . den<sup>-1</sup>. Hodnoty metylace histonu H3K4 (H3K4me2) v oocytech, histonu H3K9 (H3K9me3) ve dvoubuněčných embryích a množství heterochromatin proteinu 1 (HP1) v blastocystách se významně lišily od kontrolní skupiny. Zároveň došlo i k signifikantnímu zvýšení počtu jednotlivých blastomer u blastocyst vyplachovaných po BPS expozici. Naopak u blastocyst nebylo prokázáno výraznější poškození DNA v závislosti na BPS, které bylo určováno pomocí detekce fosforylovaných H2AX foci. Uvedené změny byly nejvýraznější po expozici velmi nízkou dávkou BPS (0.1 ng . g ž. hm.<sup>-1</sup> . den<sup>-1</sup>.) a ve výsledcích se zároveň projevovala nelineární závislost na použité koncentraci, která je pro endokrinní disruptory typická.

Předkládané experimenty potvrdily hypotézu, že BPS ovlivňuje negenomické a epigenetické kvalitativní markery u myších oocytů a embryí. Koncentrace, ve kterých byl

BPS použít, byly relevantní ke koncentracím nacházejícím se v životním prostředí, a tedy představují reálné riziko pro jim vystavené jedince. Zároveň jsou tyto koncentrace řádově nižší než stanovené bezpečnostní limity pro BPA, ze kterých se v této práci vycházelo z důvodu neexistence takových limitů stanovených přímo pro BPS. Ovlivnění meiotického vřetene může mít důsledky ve vzniku aneuploidí a nemožnosti vývoje embrya po oplození takového oocyty spermií. Zvýšený počet takto poškozených oocytů izolovaných v rámci IVF cyklů také rapidně snižuje úspěšnost takových léčebných cyklů. Mechanismus účinku BPS na poškození dělicího vřetene není dosud zcela znám. Poškození může nastat v důsledku ovlivnění kontrolních mechanismů, sledujících strukturu vřetene a jeho správné připojení k chromosomům a zajišťujících tak správné načasování anafáze. Spekuluje se také o změnách v dráze MAPK a negativních estrogenních účincích BPS na průběh meiotického zrání.

Ovlivnění epigenetických mechanismů je jedním ze známých efektů endokrinních disruptorů. Změny v epigenetickém pozadí oocytů a embryí nemusí mít jasně se projevující efekt, ale mohou stát za mnohými idiopatickými i konkrétními poruchami embryonálního a postnatálního vývoje. Tyto změny navozené endokrinními disruptory se pak mohou projevit až v pozdějším věku ovlivněného jedince, například v pubertě, kdy naplno dochází k expresi hormonů i jejich receptorů. Změny se pak mohou přenášet na další generace bez ovlivnění jejich genetické výbavy. Během vývoje gamety i embrya dochází k zásadním epigenetickým událostem demetylace a remetylace DNA a souvisejících histonů, jejichž změněný průběh může mít následky jak pro postiženého jedince, tak i pro jeho potomky. Snižovaná DNA metylace po expozici BPS tedy může vést k nedostatečnému genomickému imprintingu a souvisejícím poruchám v embryoblastu i vývoji placenty. Změny v histonových modifikacích dále předurčují míru exprese genů a mohou ovlivnit vývoj časného embrya a korektní průběh aktivace embryonálního genomu, která je závislá na pro transkripční faktory přístupném chromatinu. Zdánlivě pozitivní efekt zvýšeného počtu blastomer po expozici BPS může mít příčinu v selhávajícím mechanismu molekulárních checkpointů mitotického dělení. Další výzkum by měl být zaměřen na ovlivnění kvalitativních markerů oocytů a embryí u následujících generací, které by potvrdzovalo transgenerační efekt vyvolaný expozicí BPS.

Tato práce přináší nové výsledky ohledně vlivu BPS na savčí reprodukci prezentované na myším experimentálním modelu. Takové výsledky jsou ve shodě z předchozími studiiemi efektů BPS i BPA. Z výsledků vyplývá, že náhrada BPA jeho strukturním analogem BPS je nežádoucí a jakýkoli podobný postup by měl být v budoucnu kriticky zhodnocen. Zároveň upozorňují na skutečnost neadekvátně zvolených bezpečnostních referenčních hodnot pro BPA, stejně jako na neexistenci takových limitů pro BPS. Další postup regulace těchto látek by měl být koordinován v zájmu celosvětového lidského zdraví i životního prostředí, do kterého se tyto chemické látky uvolňují.

**Klíčová slova:** bisfenol S, oocyt, embryo, fertilizace, embryonální vývoj, epigenetika