

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Vliv bisfenolu S na expresi a lokalizaci estrogenových receptorů beta během meiotického zrání oocytů prasete

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Veronika Hoskovcová

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: Ing. Kristýna Hošková, Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 13. dubna 2017

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí Ing. Kristýně Hoškové, Ph.D. za báječný přístup, užitečné rady a především za trpělivost během psaní diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat za podporu své rodině a přátelům, jmenovitě Ondrovi, Luce a Hance.

Vliv bisfenolu S na expresi a lokalizaci estrogenových receptorů beta během meiotického zrání oocytů prasete

Souhrn

Reprodukční biotechnologie se v současné době velmi rychle vyvíjí. K jejich rozvoji je potřeba dostatečný počet kvalitních a oplození schopných oocytů, jejichž vývoj lze sledovat během kultivace *in vitro* a zjišťovat tak nové poznatky. Meiotické zrání oocytů je složitý děj řízený mnoha signálními kaskádami a různými vnitřními i vnějšími faktory. Jedním z exogenních faktorů zasahujících do vývoje a zrání oocytů jsou i endokrinní disruptory, včetně bisfenolů.

Nejrozšířenějším je bisfenol A (BPA), u kterého byly prokázány negativní účinky na reprodukční soustavu samic, především na dělohu, vaječníky, oocyty a i samotnou fertilitu samic. Kromě dospělých jedinců je ohrožen i vývoj plodů, protože BPA prostupuje přes placentu. Často je diskutován i vliv BPA na obezitu, diabetes, rakovinu, kardiovaskulární onemocnění nebo poruchy štítné žlázy. Z důvodu těchto negativních důsledků byl BPA v některých výrobcích nahrazen bisfenolem S (BPS). Jeho účinky, co by potenciálního endokrinního disruptoru, nejsou zcela prozkoumány a data o účincích BPS jsou velmi omezená. Jedná se o novou látku, která ještě není dostatečně legislativně regulovaná, na rozdíl od BPA.

Cílem této diplomové práce bylo ověření hypotézy, podle které BPS ovlivňuje lokalizaci a expresi estrogenových receptorů beta ($ER\beta$) v prasečích oocytech v průběhu meiotického zrání. Výsledky prokázaly, že BPS má vliv na distribuci $ER\beta$ v prasečím oocytu v průběhu celého meiotického zrání. U jednotlivých koncentrací BPS docházelo k redistribuci $ER\beta$ po 24 i 48 hodinové kultivaci. Zároveň byl potvrzen i vliv BPS na množství $ER\beta$ během meiotického zrání. Po 24 hodinové kultivaci oocytů *in vitro* byl pozorován nárůst množství $ER\beta$ v závislosti na dávce, zatímco po 48 hodinové kultivaci se projevil efekt nízké dávky, vlastnost typická pro endokrinní disruptory. Zdá se tedy, že i v případě BPS by se mohlo jednat o politováníhodnou náhradu za BPA.

Klíčová slova: bisfenol S, prase, estrogenový receptor, oocyt

Influence of bisphenol S on expression and localization of estrogen receptors beta during meiotic maturation of porcine oocytes

Summary

The reproductive biotechnologies are developing very quickly today. We need a sufficient number of quality oocytes, whose evolution can be observed during in vitro culture and discover new knowledge. Meiotic maturation of oocytes is complex process controlled by many signaling pathways and various internal and external factors. One of the exogenous factor affecting the development and maturation of oocytes are also endocrine disruptors, including bisphenols.

Bisphenol A (BPA) is the most widely used. It has been proved its negative effects on the female reproductive system, especially the uterus, ovaries and oocytes and female fertility itself. In addition to adult individuals, there is a risk of disturbance in the development of fetuses, because BPA passed through the placenta. The influence of BPA to obesity, diabetes, cancer, cardiovascular disease or thyroid disorder is often discussed. Because of these negative effects of BPA, it was replaced in certain products by bisphenol S (BPS). BPS could be also endocrine disruptor, but its effects are not fully understood, and data about the effects of BPS are very limited. It is a new substance, that the legislatively is not yet sufficiently regulated, in contrast to BPA.

The aim of this thesis was to verify the hypothesis, that the BPS affects the expression and localization of estrogen receptors beta ($ER\beta$) in porcine oocytes during the meiotic maturation. The results approved the influence of BPS on the distribution of $ER\beta$ during meiotic maturation. $ER\beta$ were redistributed in the individual concentrations of BPS after 24 and 48 hours. At the same time, amount of $ER\beta$ was dependent upon BPS during meiotic maturation. Culturing for 24 hours demonstrate that $ER\beta$ expression is dependent on dose BPS, whereas the 48 hours culture period resulted in low dose effect, typical attribute of endocrine disruptor. So it seem that BPS could be an unfortunate substitute for BPA.

Keywords: bisphenol S, pig, estrogen receptor, oocyte

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Cíl práce	2
3 Literární přehled.....	3
3.1 Oogeneze	3
3.1.1 Fáze množení	3
3.1.2 Fáze růstu	5
3.1.3 Fáze zrání	9
3.1.3.1 Jaderné zrání	9
3.1.3.2 Cytoplasmatické zrání	11
3.2 Vybrané faktory ovlivňující meiotické zrání.....	11
3.2.1 MPF, MAPK, cAMP	11
3.2.2 Hormonální řízení oogeneze a folikulogeneze	14
3.3 Endokrinní disruptory	16
3.3.1 Rozdělení EDs	16
3.3.2 Charakteristika endokrinních disruptorů	17
3.3.3 Bisfenol A	22
3.3.4 Bisfenol S.....	24
3.4 Vliv BPA na samičí pohlavní soustavu.....	25
3.4.1 Hypotalamický systém.....	26
3.4.2 Děloha, vejcovody a placenta	27
3.4.3 Vaječníky a oocyty	27
3.5 Vliv BPS na pohlavní soustavu	29
4 Materiály a metodika.....	31
4.1 Získávání ovárií.....	31
4.2 Izolace a výběr oocytů.....	31
4.3 Kultivace a příprava kultivačního média	31
4.4 Imunocytochemie	32
4.5 Analýza obrazu.....	34
4.6 Statistická analýza.....	34
4.7 Design experimentů.....	34
4.7.1 Experiment č. 1	34
4.7.2 Experiment č. 2	34
5 Výsledky	35
5.1 Distribuce ERβ v oocytech během meiotického zrání.....	35
5.2 Exprese ERβ v oocytech během meiotického zrání.....	39

6	Diskuze	41
7	Závěr.....	46
8	Seznam použité literatury.....	47

1 Úvod

Obor reprodukčních biotechnologií se v současné době stále více rozvíjí. Cílem tohoto oboru je především úspěšná reprodukce, jak u lidí, tak i u hospodářských zvířat. Nové technologie reprodukce umožňují chovatelům získávat potomky od jedinců s nejlepšími vlastnostmi a genetickou výbavou pomocí nejrůznějších metod, jako je embryotransfer nebo umělá inseminace. Výborným experimentálním modelem pro studium reprodukce na úrovni gamet (oocytů) je prase, a to nejen vzhledem k možnosti využití vaječníků z jatek, ale také vzhledem k tomu, že získané výsledky lze aplikovat nejen na hospodářská zvířata, ale mohou sloužit i jako model pro reprodukci člověka. Prasečí a lidské oocyty jsou si totiž velmi podobné nejen velikostí, ale i délkou a průběhem jejich meiotického zrání.

Aby se tyto technologie mohly rozvíjet, je potřeba získat oocyty, které budou meioticky kompetentní a schopné úspěšného oplození. Sledování vývoje oocytů během kultivace v laboratorních podmínkách *in vitro* umožňuje pozorování procesů probíhajících v oocytu. Meiotické zrání je řízeno mnoha endogenními (MAP kináza, MPF, hormony) a exogenními faktory, kam patří i endokrinní disruptory, které jsou v současné době velmi intenzivně studované, především skupina bisfenolů.

Endokrinní disruptory jsou látky s estrogenními vlastnostmi narušující endokrinní systém, tudíž i celkovou homeostázu organismu. Představují hrozbu pro lidi i zvířata, protože se vyskytují v předmětech každodenní potřeby, potravinách, ale i v prostředí kolem nás. Nebezpečí spočívá v jejich působení již při velmi nízkých dávkách. Mají negativní vliv na zdraví organismu, protože působí prostřednictvím receptorů pro steroidní hormony a napodobují jejich činnost.

Patří mezi ně i bisfenoly. Nejrozšířenějším bisfenolem je bisfenol A (BPA), který byl ale v nedávné době zakázán v některých výrobcích. Jeho používání je regulováno podle nařízení EFSA (European Food and Safety Agency), které určilo nejvyšší denní dávku BPA na 50 μg / kg / den, vzhledem k výsledkům studií prokazujícím negativní dopady na zdraví i reprodukci. Z toho důvodu se začal používat jeho strukturní analog bisfenol S (BPS), na kterém nebylo provedeno mnoho studií, proto je považován za „bezpečný“.

2 Cíl práce

Cílem práce je ověřit hypotézu, že bisfenol S ovlivňuje expresi a lokalizaci estrogenových receptorů beta v prasečích oocytech v průběhu meiotického zrání.

3 Literární přehled

3.1 Oogeneze

Oogenezí je označován vznik a vývoj oocytů, probíhající ve folikulu. Vývoj samotných oocytů probíhá již od embryonálního vývoje, kde začíná vznikem primordiálních zárodečných buněk ve vaječnících plodu samice a pokračuje následným vývojem oogonií a primárních oocytů. Během vývoje oocytů nastávají dva meiotické bloky, první již v embryonálním vývoji a druhý až po ovulaci oocytu (Wassarman et Albertini, 1994). Meióza je kompletně dokončena až po oplození. Vývoj folikulu se nazývá folikulogeneze, probíhá v kůře vaječníků, kde jsou přítomny folikuly, které postupně zvětšují svou velikost, počet granulóznic buněk až dorostou do posledního stádia Graafova folikulu s plně dorostlým oocytom, který je připraven k ovulaci. Cílem je vytvořit jeden dominantní folikul se zralým oocytom u unipar, u multipar vzniká dominantních folikulů více. Oocyt je buď oplozen, nebo podléhá atrezii. Jen zlomek oocytů je schopen dokončit folikulogenezi (Noakes et al., 2001). Vývoj oocytů je rozdělen do třech fází, fáze množení, růstu a zrání (Reece et al., 2009).

3.1.1 Fáze množení

Gonády u plodu samice se prvotně zakládají jako podélné párové lišty a prvopohlavní buňky (PGCs – primordial germ cells) je začínají osidlovat. Tyto buňky se objevují ve stěně žloutkového vřívku, v blízkosti obalu *allantois* a nejdříve migrují pasivně, poté améboidním pohybem do zadního střeva, následně pronikají do genitální lišty, kde ztrácí schopnost pohybu a diferencují se na oogonie (Sadler, 2011). Primordiální zárodečné buňky se intenzivně mitoticky dělí již během migrace do rozvíjejících se gonád, aby se co nejvíce namnožily. Mitotická aktivita se u prasečího embrya probíhá již od 13. dne a probíhá až do prvního týdne po narození (Black et Erickson, 1968). Pokud nedojde k jejich průniku do genitální lišty, nevyvinou se gonády, protože prvopohlavní buňky mají induktivní vliv na vývoj gonády ve vaječník nebo ve varle. Poté se začnou tvořit nepravidelné pruhy zvané medulární lišty (Coticchio et al., 2013). V tomto indiferentním stádiu gonád zatím ještě není možné rozlišit pohlaví. U samičího embrya se postupně provazce rozpadají na skupiny buněk a poté jsou nahrazeny vaskularizovaným stromatem, které tvoří dřev vaječníku (Noakes et al., 2001). Povrchový epitel gonády proliferuje a vznikají z něj kortikální provazce, které se nakonec rozpadnou na samostatné shluky buněk, a každý z nich obklopuje jednu nebo více prvopohlavních buněk. Gonády u prasečího embrya jsou patrné přibližně 24. až 26. den

embryonálního vývoje. Na vaječnicích se nachází maximum oogonií asi 50 dnů po páření, jejich počet dosahuje až 1 100 000, poté mitotická aktivita postupně klesá, až se úplně zastaví. Velká část oocytů odumírá apoptózou nebo nekrózou po narození samice. Přibližně od 40. dne embryonálního vývoje samice vstupují oogonie do meiózy, při které dochází k redukci počtu chromozomů (Wassarman et Albertini, 1994). Meióza začíná profází I, která má celkem 5 fází (Black et Erickson, 1968).

Časná profáze I (*leptotene*) bezprostředně navazuje na premeiotickou replikaci deoxyribonukleové kyseliny (DNA), kdy chromozomy zůstávají dlouhé, dekondenzované a nitkovité. V této fázi se v jádře spiralizují a kondenzují chromozomy (Wassarman et Albertini, 1994) Chromozomy jsou svými konci přichyceny k jadernému obalu. Hlavním momentem je tvorba synaptonemálního komplexu, kdy se zabudovávají bílkovinné struktury podél každého homologního chromozomu mezi sesterskými chromatidami a vytváří jakýsi skelet. Skelet nejprve formuje krátké úseky, ty srůstají do delších vláken, na konci leptotene se postupně prodlužují a ve fázi *zygotene* jsou po celé délce chromozomu (Plant et Zeleznik, 2015).

Zygotene je část profáze I, kdy se k sobě podélně přikládají a následně i párují homologní chromozomy do bivalentů. DNA se začíná kondenzovat, to vyžaduje, aby skelety okolo homologních chromozomů byly stabilní a spojeny dohromady pomocí proteinového komplexu do synapse. Jakmile jsou homology spojeny centrálním prvkem, hovoříme o synapsi. Po dokončení synapse po celé délce homologních chromozomů vstupuje buňka do třetí fáze profáze I – *pachytene* (Wassarman et Albertini, 1994).

Pachytene je nejdelší fází. Pokračuje kondenzace a zkracování chromozomu, jsou viditelné sesterské chromatidy a vytváří se tetrády ze spojených párových homologů (ze 4 chromatid). Jsou viditelná chiasmata, což jsou místa, kde se překřížují nesesterské chromatidy a začíná crossing over (Plant et Zeleznik, 2015). V *diplojene* se homologní chromozomy oddělují kvůli přerušení synaptonemálních komplexů a zůstávají spojené jen v místě chiasmat, zároveň se odpojují od jaderného obalu. Vznikají rekombinantní chromozomy díky crossing overu. U oocytů se v této fázi (*dictyotene*) zastavuje vývoj až do puberty, hovoříme o prvním meiotickém bloku (Reece et al., 2009). Nyní můžeme hovořit o tzv. primárním oocytu, jehož jádro je označováno jako zárodečný váček (GV – germinal vesicle) (Wassarman et Albertini, 1994).

Primární oocyty vstupují do prodloužené fáze klidu, která trvá až do puberty. U samic savců jsou primordiální folikuly plně vyvinuty před nebo krátce po narození, často se před

narozením na vaječnicích objevují i primární folikuly. Proliferace zárodečných buněk a folikulární vývoj jsou situovány do okrajových částí vyvíjejících se ovárií, které mají hustší kortikální oblast s folikuly a méně hustou centrální dřeň složenou z degenerujících kanálků uvnitř ovárií (McGeady et al., 2006).

Počet oocytů přítomných na vaječnicku po narození byl dříve považován za konečný, což by znamenalo, že po narození se už další oocyty na vaječnicích nevytváří. Vědci byli přesvědčeni, že konec reprodukčního období je způsoben tím, že samice nejsou schopny doplnit své rezervy oocytů. V současnosti je toto dogma vyvráceno. Poprvé se touto otázkou začali zabývat v roce 2004, kdy byly na vaječnicích mladých myší objeveny mitoticky aktivní zárodečné buňky z řad GSC (germline stem cells) (Johnson et al., 2005).

Všechny oocyty, které vstupují do meiotického dělení, jsou obklopeny plochou vrstvou pregranulóznic buněk a vytváří primordiální folikuly (Noakes et al., 2001). Před narozením se počet primordiálních folikulů pohybuje okolo 500 000 a v pubertě klesá na 420 000. Některé z primordiálních folikulů se začínají vyvíjet v primární ještě před narozením (Gosden et Telfer, 1987). Při narození jsou na vaječnicích přítomny tisíce primordiálních, ale i primárních folikulů. Brzy po narození se na vaječnicích začínají vyvíjet rostoucí folikuly složené z oocytu, několika vrstev granulóznic buněk a bazální membrány (Noakes et al., 2001).

3.1.2 Fáze růstu

Růstová fáze primárních oocytů je velmi dlouhá, trvá až do ukončení pohlavní činnosti. V průběhu dochází k jejich několikanásobnému zvětšení oproti oogoniím (Reece et al., 2009). V pubertě, během každého ovariálního cyklu, vstupuje několik primárních oocytů do růstové fáze. V průběhu růstové fáze se oocyty nemnoží, pouze nabývají na objemu. Zvětšuje se hlavně objem cytoplasmy a dochází k reorganizaci organel přítomných v cytoplasmě. Nové uspořádání je závislé na tvorbě nových genových produktů a organel, ale i na modifikaci a přerozdělení organel stávajících. Spolu s obrovským nárůstem ribonukleové kyseliny (RNA) a syntézy proteinů roste i počet ribozomů a dalších buněčných organel. Roste počet mitochondrií i Golgiho aparátu. U mitochondrií dochází ke změně jejich morfologie, tvarově i strukturálně se proměňuje i Golgiho aparát, velikostní změny prodělávají i ribozomy a organely endoplasmatického retikula (Moor et Warnes, 1978). Golgiho komplex se v průběhu růstu oocytů přemisťuje k membráně oocytu, kde se začínají vytvářet kortikální granula obsahující proteolytické enzymy, které jsou důležité pro kortikální reakci. Golgiho

komplex hypertrofuje, prolifereje a tvoří se z něj kortikální granula. Nejdříve jsou viditelné malé váčky vytvořené z Golgiho komplexu, které migrují do subkortikální oblasti oocytu, váčky se zde spojují a tvoří zralá kortikální granula, které se nakonec odpojí od Golgiho komplexů (Liu, 2011).

Organely mění vzhled a dochází k jejich rozptýlení po obvodu oocytu. Jednou z nejvýraznějších změn růstové fáze je vznik glykoproteinové membrány *zona pellucida* (Jooné et al, 2016). Růst oocytu nejprve koreluje s růstem folikulu, poté se oocyt už nezvětšuje, ale růst folikulu i nadále pokračuje. Oocyt není schopen dokončit první meiotické zrání, dokud nedosáhne velikosti plně dorostlého oocytu, která je druhově specifická. V růstové fázi zvětší oocyt praseť svůj průměr z 30 na 120 μm (Moor et Warnes, 1978). Rychlost růstu oocytu je přímo úměrná počtu granulózniých buněk s ním spojených, granulóza zvětšuje povrchovou plochu oocytu, tím se zvyšuje i rychlost vstupu malých molekul důležitých pro růst a vývoj skrze gap junctions (Eppig, 1991).

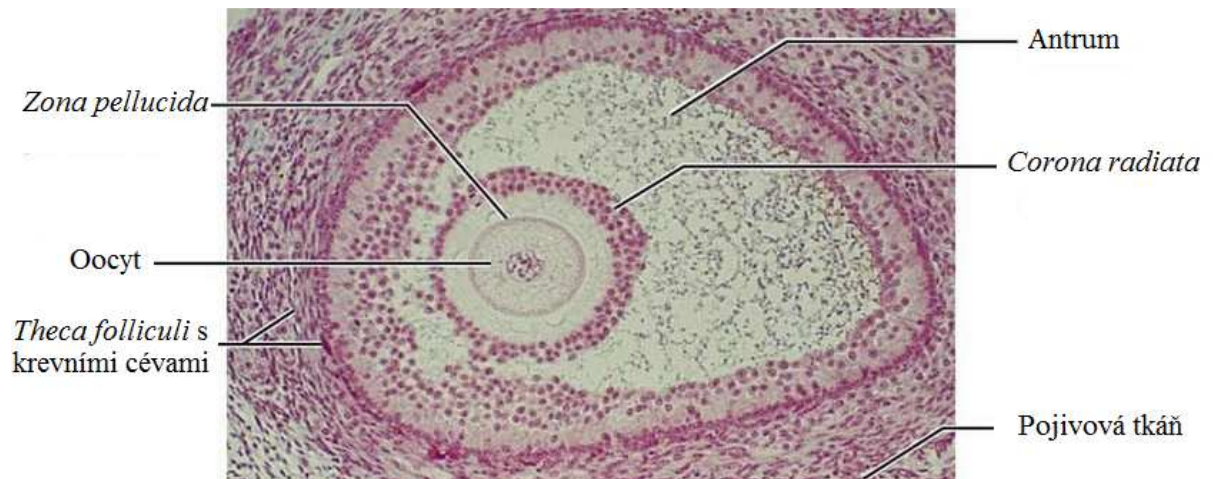
Během vývoje folikulů komunikují buňky granulózy s oocytem prostřednictvím *zona pellucida* a gap junctions. Jedná se o mezibuněčné spoje procházející *zona pellucida*, které umožňují obousměrnou komunikaci (Eppig, 1991). Gap junctions jsou soubory intracelulárních membrán, které zprostředkovávají sdílení malých molekul (do 1 kDa). Jsou složeny z konexinů – homologní řada více než 20 proteinů. Ve vyvíjejících se folikulech tyto kanály spojují rostoucí oocyt a jeho granulózni buňky do funkčního syncitia. Během růstu oocytu fungují jako spojka s okolními folikulárními buňkami. Objevují se od primordiálních folikulů až po terciární a jsou nezbytně nutné pro zajištění energetického metabolismu tudíž i k růstu oocytu. Slouží i k dodávání nukleotidů, aminokyselin a fosfolipidů, udržují iontovou rovnováhu, stabilitu messenger ribonukleové kyseliny (mRNA) ve zrajícím oocytu (Herlands et Schultz, 1984), přenáší i některé signální molekuly (cyklický adenosin monofosfát - cAMP, vápník) a podílejí se na dosažení meiotické kompetence (Eppig, 1994).

Během růstu oocytu se zvětšuje i folikul. Dochází k přeměně plochých folikulárních pregranulózniých buněk obklopující oocyt na kubické, až vytvoří jednu souvislou vrstvu tvořící primární folikul. Granulózni buňky jsou stále v jedné vrstvě (Eppig, 1994). Pouze část primárních folikulů se dále vyvíjí v sekundární folikuly, kdy získají druhou vrstvu granulózniých buněk díky pokračující proliferaci granulózy. K iniciaci vývoje v sekundární folikul je potřeba především folikulostimulační hormon (FSH). Sekundární folikul je preantrální váček se dvěma až deseti vrstvami kvádrových nebo nízkých cylindrických buněk. Typický sekundární folikul obsahuje oocyt a obklopený *zona pellucida*, několik vrstev

granulózy a bazální laminu. Vývoj probíhá v průběhu puberty, během ovariálního cyklu. To znamená, že některé mohou být v klidovém stádiu i několik let (Reece et al., 2009).

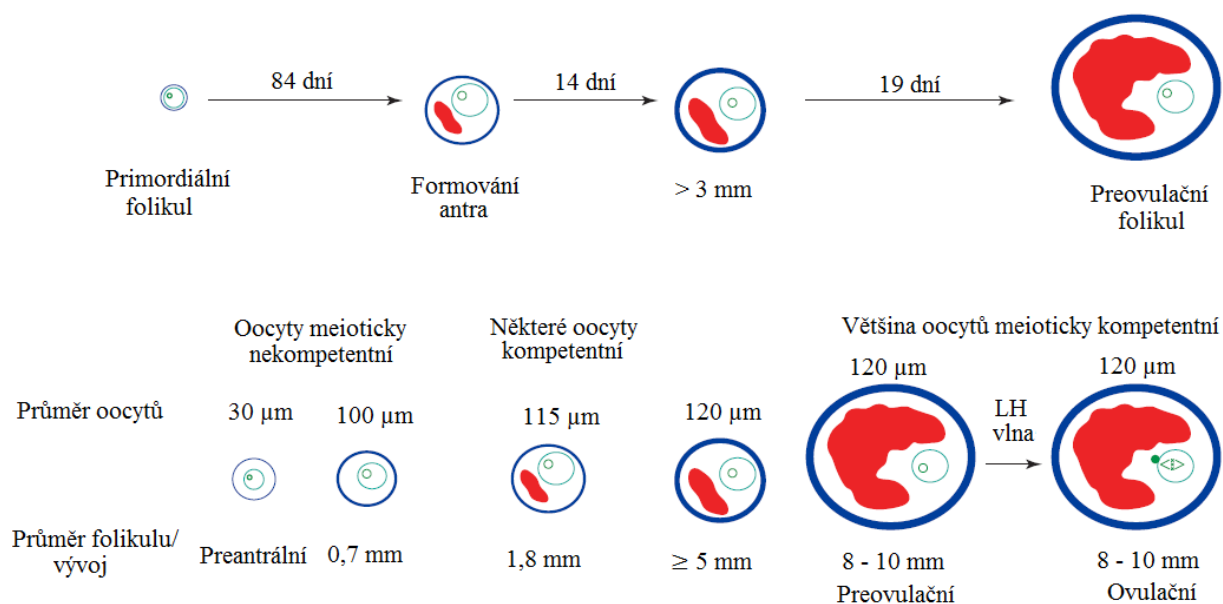
Zásadním momentem je rozvoj tkáně *theca* okolo granulózy - *theca folliculi interna* (je bohatě prokrvená a obsahuje buňky tvořící progesteron a androgeny) a *theca folliculi externa* (hladkosvalové buňky inervované autonomním nervovým systémem, které mají důležitou roli při ovulaci). Vznik *theca* je doprovázen vývojem nových cév (Wassarman et Albertini, 1994). Pro správný vývoj folikulu je nezbytný hormon 17- β -estradiol (E2), který své účinky zprostředkovává skrze estrogenové receptory (ER) ER α a ER β (Bolli et al., 2010). Během vývoje sekundárního folikulu dokončí primární oocyt svůj růst a je u něj dobře viditelné ohraničené jádro, které tvoří zárodečný váček (Jooné et al., 2016). Jakmile dosáhne své maximální velikosti, už více neroste a je schopen znovu obnovit meiotické zrání (Wassarman et Albertini, 1994).

Posledním stádiem folikulogeneze je terciární a následně Graafův folikul. Vyznačuje se dutinou vyplněnou folikulární tekutinou. ER β hraje důležitou roli ve vývoji antrálního folikulu, protože je nebytný pro tvorbu antra a pro dozrávání preovulačního folikulu. U prasnice můžeme první Graafův folikul pozorovat již 70 dnů po narození (Hunter, 2000). Uvnitř Graafova folikulu se nachází *cumulus oophorus* (vejconosný hrbolek), který je tvořen těsně spojenými kumulárními buňkami obklopujícími oocyt. Vnitřní vrstva *cumulus oophorus* se nazývá *corona radiata*. V důsledku zvýšení hladiny luteinizačního hormonu (LH) před ovulací začnou kumulární buňky produkovat kyselinu hyaluronovou, ta se ukládá do mezibuněčných prostor a dochází k expanzi kumulu (Tanghe et al., 2002). Kumulární buňky mají tři důležité funkce. Před ovulací podporují zrání oocytu, během ovulace vedou oocyt do vejcovodu a krátce po ovulaci se podílí na mechanismu ovládající přístup spermie do oocytu (Tesařík et al., 1990) Oocyt ve folikulu se nejprve nachází v centrální pozici, s růstem folikulu je přesunut excentricky. Jakmile je oocyt i folikul plně dorostlý (viz Obrázek č. 1), dochází k ovulaci, folikul praskne, oocyt se *zona pellucida* a granulózními buňkami ho opouští a putuje vejcovodem k děloze (Wassarman et Albertini, 1994).



Obrázek č. 1: Graafův folikul s oocytem. Převzato z: <https://www.mp3ringtone.info/jpgopng-ovary-histology-labeled-graafian-follicle.html>

Meiotická kompetence je u savců vyjádřena vztahem mezi velikostí oocytu a schopností znovuoobnovení meiotického zrání (viz Obrázek č. 2) a je definována jako schopnost oocytu dokončit meiotické zrání. Zisk meiotické kompetence probíhá ve dvou fázích, nejdříve jsou oocyty schopné zahájit zrání, podstoupit rozpad zárodečného váčku (GVBD - germinal vesicle breakdown) a dosáhnou metafáze I - částečná meiotická kompetence. Potom získá oocyt schopnost dokončit vývoj až do metafáze II - plná meiotická kompetence. Jen oocyty, které mají dokončený růst, se stávají meioticky kompetentní. Schopnosti pokračovat v meióze (GVBD) je u prasečích oocytů dosaženo, pokud je Graafův folikul větší než 0,8 mm, poté mohou dojít do metafáze II. Pro dokončení meiotického zrání je potřeba, aby měl folikul velikost alespoň 2 mm v průměru, oocyt potom minimálně 115 μm (Motlík et al., 1984). Meiotická kompetence je získávána až v pozdních fázích folikulogeneze (Eppig, 1994).



Obrázek č. 2: Růst oocyty a folikulu a nabývání meiotické kompetence u prasat. Převzato z Hunter, 2000.

3.1.3 Fáze zrání

Meiotické zrání zahrnuje přeměnu plně dorostlých oocytů nacházejících se v Graafových folikulech na oocyty ve stádiu druhé metafáze připravené k oplození. Meióza je obnovena po dosažení pohlavní dospělosti, po prudkém zvýšení luteinizačního hormonu (LH peak) těsně před ovulací. Konečným produktem meiózy je haploidní vajíčko (Kishimoto, 2003). Krátce po LH vlně dochází k narušení spojů *gap junctions* procházející *zona pellucida* a je zahájeno zrání oocyty. Zrání probíhá jak v cytoplasmě, tak v jádře. Při jaderném zrání se oocyt dostává do druhého meiotického bloku. V cytoplasmě jsou změny závislé na hormonálních změnách v průběhu zrání. Jen zlomek oocytů v každém cyklu je schopen ovulovat, u prasnice se počet pohybuje mezi 14 až 20 oocytů (Foxcroft et Hunter, 1985).

3.1.3.1 Jaderné zrání

Jaderné zrání zahrnuje progresi oocytů ze stádia zárodečného váčku do metafáze II. Skládá se z GVBD a kondenzace chromozomů (probíhá v poslední fázi profáze I - *diakineze*), metafáze I, kdy se formuje dělicí vřetenko, oddělují se homologní chromozomy s vyloučením prvního pólového tělíska a dochází k zastavení v metafázi II (Kubelka et al., 1988). Jádro oocyty tvoří zárodečný váček s kompaktní membránou, chromatin není kondenzovaný a zaujímá kruhovitý nebo podkovovitý tvar. Během GVBD, které je vyvoláno zvýšenou hladinou LH, se jaderná membrána vlní, až jaderné póry mizí. Následuje fragmentace membrány, která poté zmizí stejně jako jádérko (Reece et al., 2009).

Změny v uspořádání zárodečného váčku probíhají na chromatinu během růstu a zrání oocyty. GV chromatin se dá rozdělit do 5 konfigurací (GV 0-4), podle stupně jeho kondenzace, přítomnosti jadérka a zmizení jaderné membrány (Sun et al., 2001). Malé antrální folikuly na prasečích vaječnicích obsahují oocyty s dekonenzovaným chromatinem v celé oblasti jádra a tvoří konfiguraci GV0. Během folikulárního vývoje chromatin kondenzuje a vytváří jaderný lem (také se mu říká konfigurace do tvaru podkovy) u transkripčně neaktivních GV1 oocytů (Motlík et Fulka, 1976). Nukleoplasma je jemně zrnité. GV1 a GV2 konfigurace představují časná a pokročilejší stádia, dochází k remodelaci chromatinu. Proces začíná výskytem několika ložisek kondenzace v GV1 oocytech a pokračuje tvorbou typických shluků kondenzovaného chromatinu v GV2 oocytech, jaderná membrána, jadérko a nukleoplasma se zatím nemění. GV2 konfigurace je první známkou GVBD (Nagai et al, 1997). GV3 je stádium, ve kterém je chromatin maximálně kondenzovaný a je organizován do jednoho shluku (Coticchio et al, 2013), nukleoplasma ztrácí svou granulaci, jaderná membrána je stále zřetelná. Shluky chromatinu na jaderné membráně jsou spojené s chromatinem kolem jadérka, které přestává být viditelné. Síť chromatinu je rozptýlená po celém jádru. Poslední stádium GV4 se vyznačuje tím, že jaderná membrána není tolik výrazná, jadérko mizí úplně. Chromatin vytváří nepravidelnou síť anebo vláknité bivalenty (Nagai et al, 1997).

Oocyt přechází do první metafáze, kdy se bivalenty začnou srovnávat do ekvatoriální roviny, jejich centromery směřují k opačným pólům buňky. Vytvoří se dělicí vřeténko, jehož mikrotubuly jsou napojeny na kinetochory centromer (místo na centromeře, kam se upínají mikrotubuly vřeténka). Potom se oocyt dostává do anafáze I. V této fázi se oddělují homologní chromozomy z bivalentů a putují k opačným pólům buňky, segregace je náhodná. Dochází k redukci chromozomů na polovinu, buňka se začíná zaškrcovat a každá polovina má haploidní počet chromozomů. Následuje poslední fáze prvního heterotypického dělení – telofáze. Chromozomy se částečně dekonenzují, dělicí vřeténko se rozpadá. V pozdní telofázi se buňka úplně rozdělí na dvě, cytoplasma se dělí asymetricky a vzniká nová jaderná membrána (Noakes et al., 2001).

První a druhé (homeotypické) meiotické dělení rozděljuje interfáze, nedochází ovšem k replikaci DNA. Interfáze je velmi krátká, jednotlivá dělení na sebe skoro navazují. V profázi II se chromozomy spiralizují, jaderná membrána se rozpadá (Wassarman et Albertini, 1994). Přichází metafáze II, kdy se chromozomy řadí do ekvatoriální roviny. V tomto okamžiku se vyděluje první pólové tělísko a dochází ke druhému meiotickému bloku. Pólové tělísko

obsahuje kromě chromozomů i další organely jako například mitochondrie, ribozomy nebo kortikální granula. Vývoj oocyty je kompletně dokončen až po oplození. Druhé pólové tělíčko se vyděluje až po průniku spermie do oocyty. Pólocyty následně zanikají a resorbují se (Sadler, 2011).

3.1.3.2 Cytoplasmatické zrání

Cytoplasmatické zrání zahrnuje mnoho událostí, při kterých dochází k biochemickým a morfologickým změnám v oocyty jako je přeuspořádání cytoplasmy, změny na jednotlivých organelách a syntéza mRNA. V průběhu vývoje oocyty se mění morfologie a umístění mitochondrií, u prasečích oocytů jsou mitochondrie umístěny z počátku zrání po obvodu a mají kulatý tvar, později jsou oválné a jsou rozmístěny rovnoměrně. U prasat je počet mitochondrií výrazně redukován a jejich objem se zvětšuje až 300 x (Cran, 1985). Jejich pohyb v cytoplasmě závisí na mikrotubulech. Množství Golgiho aparátů je přímo úměrné průměru folikulu a zvyšuje se během zrání oocyty. Během cytoplasmatického zrání dochází v Golgiho aparátu k syntéze kortikálních granul, která jsou nejprve v centru oocyty, okolo první metafáze se přemisťují k periférii oocyty a váží se k plazmatické membráně. Jejich umístění je důležité pro normální oplození, protože uvolnění granulí mění chemické vlastnosti *zona pellucida* a zabraňuje polyspermii (Wassarman et Albertini, 1994). Změny prodělává i endoplasmatické retikulum. V profázi I má endoplasmatické retikulum podobu jemné vláknité sítě, po GVBD se mění na hustý prstenec, který je lokalizován ve středu oocyty, ve druhé metafázi prstenec zmizí a vytváří jen typickou vrstvu shluků endoplasmatického retikula (Ajduk et al., 2008).

3.2 Vybrané faktory ovlivňující meiotické zrání

Meiotické zrání je řízeno mnoha faktory a signálními kaskádami, které ovlivňují průběh meiozy prostřednictvím fosforylace nebo defosforylace proteinů. Mezi nejvýznamnější faktory ovlivňující meiotické zrání patří MPF (metafázi podporující faktor), MAPK (mitogeny aktivovaná proteinkináza), cAMP (cyklický adenosin monofosfát), PKA (proteinkináza A) nebo vápníkové ionty Ca^{2+} (Alberts et al., 1998).

3.2.1 MPF, MAPK, cAMP

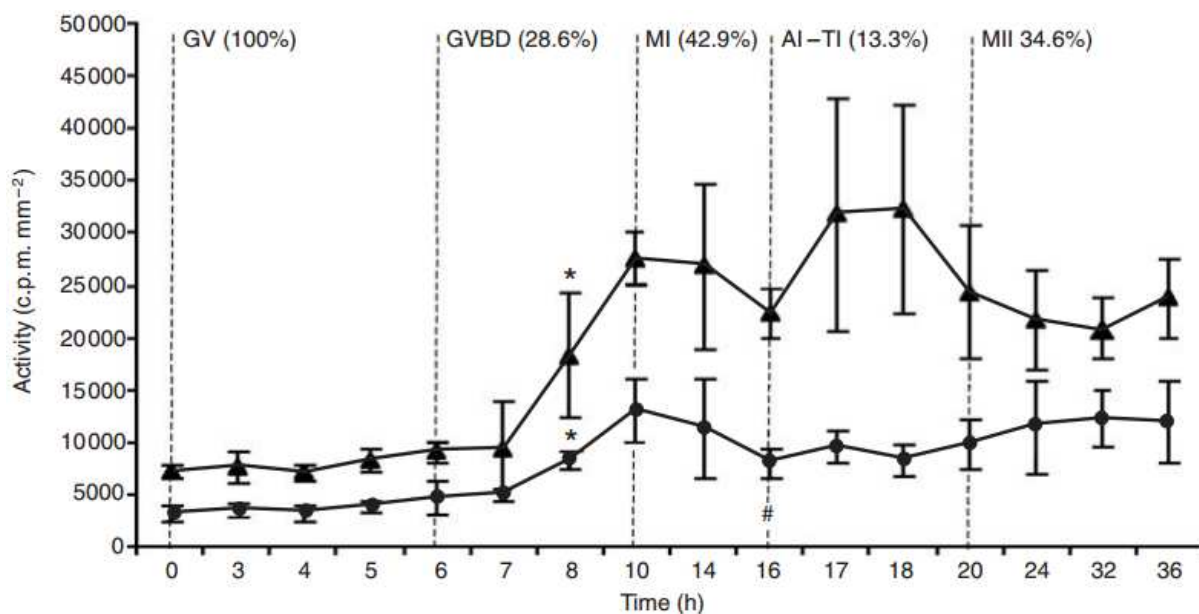
Pro obnovení meiotického zrání oocytů zastavených v prvním meiotickém bloku je nezbytná aktivace MPF, tvořeného dvěma subjednotkami, každá z nich má odlišnou funkci. Jedná se o jednotku katalytickou - CDK1 (cyklin dependentní kináza 1, označována také jako

Cdc2 - cell division cycle 2 kinase) a regulační - cyklin B1. Koncentrace CDK1 a cyklinu B1 se v průběhu meiotického zrání mění. CDK jsou v oocytu po celou dobu buněčného cyklu, jejich činnost je řízena pomocí regulační subjednotky a odpovídá jejich koncentraci v oocytu (Alberts et al., 1998). Nejprve se hromadí v oocytu v podobě neaktivního pre – MPF, k jeho aktivaci dochází až po spojení podjednotek CDK1 a cyklinu B1. V rostoucím oocytu se vyskytuje CDK1, ale pre – MPF je stále v neaktivním stavu, dokud oocyt neukončí svůj růst (Kishimoto, 2003). Nízká aktivita CDK1 je klíčem k zachování prvního meiotického bloku. Pro obnovení meiózy je tedy nutné zvýšit koncentraci CDK1 i syntézu cyklinu B. CDK1 je aktivována pomocí cdc25 fosfatázy, která odstraní inhibiční fosfátovou skupinu. cdc25 fosfatáza je řízena a aktivována prostřednictvím kinázy Plk (polo – like kináza). Hladina MPF osciluje během meiózy a nárůst probíhá těsně před zahájením GVBD. Fosforylace určitých cílových molekul (jako například DNA nebo proteiny tvořící jadernou membránu) pomocí MPF vede ke GVBD, objevuje se dělicí vřeténko a chromozomy kondenzují (Stojkovic et al., 1999). Na aktivaci cdc25 a zvýšení MPF se podílejí i některé intracelulární molekuly, např. cAMP. Při snížení koncentrace cAMP uvnitř oocytu, dochází k aktivaci fosfatázy cdc25 a zvýšení aktivity MPF. Na regulaci MPF se podílí i cyklin B, který během buněčného cyklu mění svou koncentraci, během interfáze koncentrace stoupá, a po průchodu buňky M – fází klesá až na nulu (Alberts et al., 1998).

Dalším důležitým faktorem je MAPK, patří do skupiny serin / threonin kináz. MAP kináza se uplatňuje při přenosu extracelulárních signálů do buňky, proto se také označuje jako ERK (extracelulární regulované kinázy, ERK1, ERK2) (Stojkovic et al., 1999). Je zodpovědná za přechod oocytu z první do druhé metafáze, dále má vliv na tvorbu dělicího vřeténka, organizaci mikrotubulů, kondenzaci chromatinu, vydělení prvního pólového tělíska a druhý meiotický blok. MAP kináza je syntetizována v rostoucích oocytech, ale i v granulózniích buňkách, a je nejdříve neaktivní. K aktivaci dochází prostřednictvím kaskád, kdy se nejdříve aktivuje MAPKKK (mitogen aktivovaná proteinkináza kinázy kinázy), ta aktivuje MAPKK (mitogen aktivovanou proteinkinázu kinázy), která aktivuje MAPK (Roux et Blenis, 2004). V době aktivace MAPK v průběhu meiotického zrání jsou mezidruhové rozdíly, u prasete není zcela jasné, jestli je MAPK aktivována před MPF nebo po něm, převládají však názory, že nejdříve se aktivuje MAPK a poté až MPF (Sugiura et al., 2005). Obecně platí, že k aktivaci MAPK dochází před GVBD. Aktivace MAPK je důležitá pro opětovné zahájení meiózy, k její aktivaci je nutné i působení LH, který podporuje fosforylaci konexinu 43 (hlavní protein vyskytující se v gap junctions) a vyvolává pokles propustnosti

gap junctions mezi granulózními buňkami (Sela-Abramovich et al. 2005). Uzavření spojů brání přívodu cyklického guanosin monofosfátu (cGMP) z granulózních buněk do oocyty, tím dochází ke snížení hladiny cGMP a dochází k odblokování inhibice fosfodiesterázy 3A (PDE3A – hlavní fosfodiesteráza přítomná v oocytech) a zvýší se hydrolýza cAMP (Norris et al., 2009). V prasečích oocytech dochází ke zvyšování MPF i ke zvýšené aktivitě MAPK, hladina MPF ovšem klesá na konci prvního zracího dělení a dochází k vydělení prvního pólového tělíska, zatímco aktivita MAPK je stále vysoká. Nízká aktivita MPF umožní oocyty přejít do anafáze. Poté se oocyt zastaví ve druhé metafázi. Oproti MPF, hladina MAPK zůstává vysoká i při přechodu do metafáze II a klesá až po aktivaci oocyty (Sun et al., 2001).

MPF aktivita prudce stoupá při GVBD, krátce po vydělení prvního pólového tělíska dojde k poklesu její aktivity. V průběhu krátké interfáze dojde znovu ke zvýšení aktivity MPF (viz Obrázek č. 3). Aktivita MPF zůstává během druhého meiotického bloku vysoká až do chvíle, kdy dojde k oplození, probíhá degradace cyklinu B1 a dochází ke snížení hladiny MPF a vydělení druhého pólového tělíska. Aktivita MAPK je stabilní během celého meiotického cyklu, k poklesu dochází až těsně před vytvořením prvojádra (Ye et al., 2003).



Obrázek č. 3: Aktivita MPF a MAPK během meiotického zrání. Převzato z Ye et al., 2003.

● aktivita MPF, ▲ aktivita MAPK.

cAMP (cyklický adenosin monofosfát) je signální molekula, která vzniká z ATP. V buňkách je využíván jako druhý buněčný posel a patří mezi inhibitory meiotického zrání (Conti, 2002). Je potřebný k udržení oocyty v prvním meiotickém bloku. Produkuje ho

samotný oocyt i folikulární buňky. Za jeho syntézu je zodpovědná především AC (adenylátcykláza) a G protein Gs. Na udržení vysoké hladiny cAMP se podílí i cGMP, který produkují kumulární buňky a oocyt. Pro udržení meiotického bloku, jsou kromě syntézy cAMP v oocytu ještě nezbytné inhibiční signály, které do oocytu přichází ze somatických buněk (Mehlmann et al., 2002). Zdrojem inhibičních signálů jsou především granulózní buňky z vnější vrstvy folikulu. Signály se do oocytu dostávají přes gap junctions, pokud tedy dojde k uzavření těchto spojů, nejčastěji vlivem LH, obnoví se meióza. Vysoká hladina cAMP brání obnovení meiózy, protože je fosforylována subjednotka CDK1 patřící do MPF, tudíž je celý komplex MPF neaktivní. Pokles cAMP je založen na inhibici aktivity adenylátcyklázy (AC), dále po celou dobu meiózy zůstávají jeho hladiny nízké (Stojkovic et al., 1999).

3.2.2 Hormonální řízení oogeneze a folikulogeneze

Ovariální cyklus představují cyklicky se opakující změny na vaječnicích specifické pro každý druh. Nezbytně se na něm podílí hormony, především gonadotropní hormon (GnRH), FSH, LH, estrogeny a progesteron. Hormony mají vliv hlavně na vývoj folikulu. Ten však na hormony reaguje jen v určitou dobu, protože folikulogeneze je ale rozdělena do dvou částí, u preantrálních folikulů je tento proces nezávislý na gonadotropinech, naopak u antrálních folikulů je folikulogeneze na gonadotropinech zcela závislá (Senger, 2003). Estrální cyklus se dělí do dvou částí, podle dominantních struktur přítomných na vaječnicích. Během folikulární fáze cyklu folikuly podstoupí rychlý růst, což vede k rozvoji jednoho nebo více zralých folikulů, z nichž každý obsahuje oocyt. Tato fáze končí ovulací a následně nastává fáze luteální (McGee et Hsueh, 2000).

K tomu, aby došlo k cyklické aktivitě, je potřeba určitá hladina hormonů, hlavně GnRH. U samic se vylučuje v neuronech hypotalamu, ale je potřeba, aby byly schopny vylučovat dostatek tohoto hormonu v reakci na zpětnou vazbu estrogenů z vaječníků, k tomu aby došlo k ovulaci. S vývojem vaječníků se zvyšuje i sekrece E2 z rostoucích folikulů. To vede i k vyššímu pulznímu vylučování GnRH, dochází ke zvyšování sekrece FSH a LH a tím pádem i k vyšší folikulární aktivitě a vytvoření receptorů pro příslušné hormony, nejdříve pro FSH, poté pro LH (Senger, 2003).

Po aktivaci hypotalamo – hypofyzárně – gonadální osy reagují folikuly na zvýšené hladiny FSH a přítomnost FSH je nezbytná pro další růst a diferenciaci folikulu. Na začátku folikulární fáze cyklu se některé časně antrální folikuly vyvinou do fáze, ve které jsou

schopné reagovat na zvyšování hladiny FSH. Stimulace gonadotropiny iniciuje cyklický nábor těchto antrálních folikulů (McGee et Hsueh, 2000). Ale jen omezený počet dosáhne preovulační velikosti, zbytek podlehne atrézii. To, který folikul přežije, záleží na dostatečném přístupu k FSH. FSH expozice granulозních buněk má za následek zvýšení syntézy E2 (Beg et Ginther, 2006). Inhibice zpětné vazby v důsledku zvýšené cirkulace E2 snižuje hypofyzární sekreci gonadotropinů, a skupina antrálních folikulů závislých na FSH soutěží o omezený přístup k tomuto hormonu. Mechanismy působící ve folikulární selekci nejsou zatím jasné, ale je pravděpodobné, že více zralé folikuly se stanou dominantními a uniknou atrézii. Granulozní buňky zrajících antrálních folikulů získávají LH receptory v reakci na FSH. Akvizice LH citlivosti může snížit závislost folikulu na FSH. (Zeleznik, 2004).

Rostoucí folikuly pod vlivem FSH a LH syntetizují a uvolňují estrogeny (hlavně E2) do oběhu. Tato syntéza probíhá v *theca folliculi interna*, kde se syntetizují androgeny, ale i v granulозních buňkách, kde se androgeny konvertují na E1 (estron) a následně na E2. Syntéza androgenů je pod kontrolou LH, zatímco FSH zvyšuje přeměnu androgenů na estrogeny v granulозních buňkách. Estrogeny se podílí i na proliferaci samotných granulозních buněk, kde působí přes estrogenové receptory umístěné na granulозních i *theca* buňkách rostoucích folikulů (Richards et al., 2002). LH také stimuluje produkci StAR (steroidogenic acute regulators) proteinu, který umožní transport cholesterolu na vnitřní stranu membrány mitochondrií, kde je přeměněn na pregnenolon, který tvoří základ estrogenů. Postupně se produkce androgenů snižuje, protože není dostatek LH receptorů a v granulозních buňkách se vyrábí regulátory syntézy androgenů (Edson et al., 2009). Ovariální estrogeny stimuluje proliferaci a vaskularizaci děložního endometria, aby bylo připravené na implantaci blastocysty v případě oplození. Vývoj mléčné žlázy je také závislý na rostoucí produkci estrogenů z ovárií. Estrogeny mají vliv i na kostní metabolismus a kardiovaskulární funkce a jsou zodpovědné za indukci LH vlny, která způsobí ovulaci. FSH kromě své úlohy ve steroidogenezi a růstu folikulů, stimuluje syntézu inhibinů, které působí zpětnou vazbou na hypofýzu a selektivně inhibují FSH uvolňování. (Zeleznik 2004).

Ovulace, která značí konec folikulární fáze a začátek fáze luteální a je v korelaci s výskytem estrálního chování. Postupné zvyšování cirkulujícího E2 vyvolává LH vlnu, která způsobuje ovulaci jednoho nebo více folikulů během několika hodin. Vlny LH a FSH se vyskytují v reakci na zvýšené GnRH před ovulací, ale velikost LH vlny převyšuje FSH vlnu (Mehlmann et al., 2002). Počet folikulů, které dozrají a ovulují je druhově specifický a závisí na počtu FSH receptorů a dostupnosti FSH. Náhlý vzestup LH vyvolá opětovné zahájení

meiosy u oocytů, které jsou v profázi I. LH peak, kromě vyvolání ovulace, zabraňuje i množení granulозních buněk prasklého folikulu a způsobuje jejich diferenciaci na žluté tělísko, typické pro luteální fázi. Folikulární bazální membrána ztrácí svou integritu, což umožňuje invazi krevních cév do bývalé granulозní vrstvy. Žluté tělísko je důležité pro udržení březosti kvůli produkci progesteronu. (Edson et al., 2009).

3.3 Endokrinní disruptory

Endokrinní disruptory (EDs) jsou podle organizace EFSA (European Food Safety Authority) definovány jako chemické látky, které mohou interagovat přímo nebo nepřímo s endokrinním systémem, cílovými orgány a tkáněmi (EFSA, 2012). EDs jsou látky exogenního původu zasahující do syntézy, sekrece, transportu, vazby, činnosti nebo eliminace přirozených hormonů v těle, které jsou odpovědné za udržení homeostázy, reprodukce a vývojových poruch (Kavlock et al., 1996).

3.3.1 Rozdělení EDs

Skupina ED je velmi různorodá, co se účinků na organismus, chemické struktury a výskytu týče. Obecně je lze rozdělit na **přírodní ED**, které se vyskytují v rostlinách a jsou tedy součástí potravin a krmiv. Patří sem mykoestrogeny, sekundární metabolity některých plísní (např. zearalenon produkován plísněmi rodu *Fusarium*), které kolonizují několik druhů plodin, např. kukuřici (Calafat et Needham, 2007). Další skupinou jsou fytoestrogeny, přírodní rostlinné látky, které mají slabou estrogenní aktivitu. Obsahuje je asi 300 druhů rostlin, především obilniny, luštěniny - hojně se nachází v sóje, sójových výrobcích a ovoci. Patří sem isoflavonoidy (genistein), lignany, kumestany (kumestrol) a steroly. Tyto látky mají poměrně nízkou vazebnou afinitu k estrogenním receptorům, ale jsou konzumovány ve velkém množství, navíc jsou i součástí kojenecké výživy – výrobky na bázi sóji (Bar-El et Reifen, 2010).

Druhou skupinu tvoří **syntetické ED**, které na rozdíl od přírodních EDs vznikají uměle, činností člověka. Patří sem chemikálie používané jako průmyslová rozpouštědla a jejich vedlejší produkty (polychlorované bifenyly (PCB), polybromované bifenyly (PBB) a dioxiny), změkčovadla (ftaláty – v obalech potravin), acidobazické indikátory (fenolftalein) pesticidy (methoxychlor, dichlordifenyiltrichlorethan – DDT), fungicidy (vinklozolin) a farmaceutické prostředky (diethylstilbestrol (DES), 17 α -ethynylestradiol v hormonální antikoncepci) a řada dalších. Poslední zmíněný se dostává z moči žen užívajících hormonální

antikoncepci do odpadních vod a dále se šíří v řekách a dostává se tak i do pitné vody (Abaci et al., 2009). Vzhledem k jeho endokrinně disruptivnímu efektu může napadat reprodukční i jiné funkce v organismu. I těžké kovy (rtuť, kadmium, olovo) mají schopnost narušovat endokrinní funkce organismu. S řadou EDs se tedy setkáváme dennodenně, protože jsou v předmětech každodenní potřeby. Velmi studovanou skupinu tvoří bisfenoly, které se díky svým vlastnostem ve velkém používají při výrobě polykarbonátových plastů, epoxidových pryskyřic, či výrobcích z termopapíru (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

3.3.2 Charakteristika endokrinních disruptorů

EDs jsou látky, které si nemusí být navzájem mezi sebou ani strukturálně podobné, až na molekulární hmotnost sloučenin, která se pohybuje většinou pod 1000 Da. Na základě chemické struktury je tedy těžké určit, zda sloučenina může nebo nemusí mít vliv na narušení endokrinní činnosti (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). EDs jsou velmi podobné E2, společným znakem je přítomnost fenolového jádra, která napodobuje přírodní steroidní hormony a umožňuje disruptorům interakci s receptory pro steroidní hormony, čímž dává EDs estrogenní vlastnosti (Vrzáňová et Heresová, 2003).

Několik skupin EDs působí jako antiandrogeny, antagonisté nebo agonisté receptorů hormonů štítné žlázy a androgeny. Některé EDs mají dlouhé poločasy rozpadu, což bylo výhodné pro jejich průmyslové využití, ale méně vhodné pro volně žijící zvířata a člověka. Tyto látky se rozpadají velmi těžko, proto nemohou být metabolizovány, případně se rozdělí do více toxických látek než má základní molekula (Dickerson et Gore, 2007).

Mechanismus účinku

Původně převládaly názory, že účinky EDs se uplatňují prostřednictvím jaderných receptorů, včetně receptorů pro estrogeny, androgeny, progesterony, thyroidní a retinoidní hormony. V současnosti víme, že mechanismy působení EDs nejsou tolik jednoduché. Působí nejen skrze jaderné receptory, ale i přes mimojaderné receptory pro steroidy (membránové estrogenové receptory), nesteroidní receptory (receptory neurotransmiterů – receptor pro serotonin, dopamin a noradrenalin). Zároveň se uplatňují složité signální a enzymatické dráhy zapojené do biosyntézy steroidů a metabolismu a další mechanismy, které mají vliv především na činnost endokrinního a reprodukčního systému (Abaci et al., 2009). EDs patří mezi velmi nebezpečné environmentální zdravotní hrozby, v důsledku toho, že EDs napodobují činnost steroidních hormonů, interagují s endokrinním systémem organismu a

mohou tak vyvíjet toxické účinky, které mohou vést k nejrůznějším abnormalitám v organismu (Vandenberg, 2014).

Významnými cílovými receptory EDs jsou ERs. Existují tři subtypy – ER α , ER β a ER γ , z nichž nejvýznamněji se uplatňují α a β suptypy. Oba typy se liší strukturou a lokalizací kódujících genů a vyskytují se v několika isoformách. ER α a ER β jsou estrogenové receptory patřící do skupiny receptorů steroidů, které se nachází jak v jádře, tak na membráně (Swedenborg et al., 2009). Způsob, jakým EDs působí na organismus je závislý na tom, jestli se EDs váží na jaderné nebo membránové estrogenové receptory. V závislosti na tom rozlišujeme genomický a nengenomický mechanismus účinku. Genomický mechanismus účinku znamená, že dochází k transportu steroidu nebo ED přes plazmatickou membránu, naváže se na intercelulární jaderný receptor (Silva et al., 2010). Pokud ER nejsou aktivované, nachází se v cytoplasmě buňky a jsou spojené s proteinem teplotního šoku hsp90. Při navázání vhodného ligandu dojde ke změně konformace, vytvoření komplexu ligand-ERE (estrogen responsible elements) a vzniku homo- nebo heterodimeru a až pak jsou schopné přemístit se do jádra, kde se váží na specifickou oblast DNA v jádře a ovlivňují transkripci a proteosyntézu různých genů (McLachlan, 1993).

Nengenomický mechanismus má vliv na buněčnou signalizaci. EDs se naváží na membránový receptor a je tak docíleno specifické buněčné odpovědi, prostřednictvím aktivace transdukčních signálních drah a produkci druhých posílů (Benassayag et al., 2002). Následuje rychlá intracelulární odpověď (trvá v rozmezí několika sekund až minut) zprostředkovaná druhým buněčným posílem, který spustí signální kaskádu. Mohou se vázat i na receptory, které ovlivňují aktivitu iontových kanálů a koncentrace různých intracelulárních prvků. Rychlé nengenomické mechanismy interagují s cytoplasmatickými signálními molekulami, jako je cAMP, AC, vápník, G – protein nebo AP-1 (aktivační protein 1) a umožňují rychlý přenos signálu (Silva et al., 2010).

ED neovlivní jen jedince, který jim byl vystaven, ale i jeho potomky a další generace. Nengenomický mechanismus účinku může v některých případech zahrnovat i zárodečné linie. Účinky se tedy nepředávají mutacemi DNA, ale prostřednictvím modifikací faktorů, které regulují genovou expresi (metylací DNA a acetylací histonů), zasahují tak i do epigenetiky (McLachlan, 1993). Epigenetika se zabývá dědičností fenotypu, která není zakódovaná v primární sekvenci nukleotidů DNA. Rodiče tedy mohou ovlivnit způsobem života zdraví svých potomků a jejich potomků (Mileva et al., 2014).

Biologické funkce estrogenu jsou zprostředkované vazbou na ERs. Geny pro tyto receptory se nachází na různých místech na chromozomech (Swedenborg et al., 2009). Odpověď na navázání na ER je daná afinitou ligandu k receptoru, počtem receptorů a koncentrací hormonu (Silva et al., 2010). Každý ED může vykazovat jinou afinitu k ER, může mít nižší či naopak vyšší afinitu než endogenní E2. U EDs obecně platí, že mají nižší vazebnou afinitu k ERs než E2, jen několik málo EDs má vyšší vazebnou afinitu k ER (např. syntetický antiestrogen 4-hydroxytamoxifen) (Lange et Meyer, 2003).

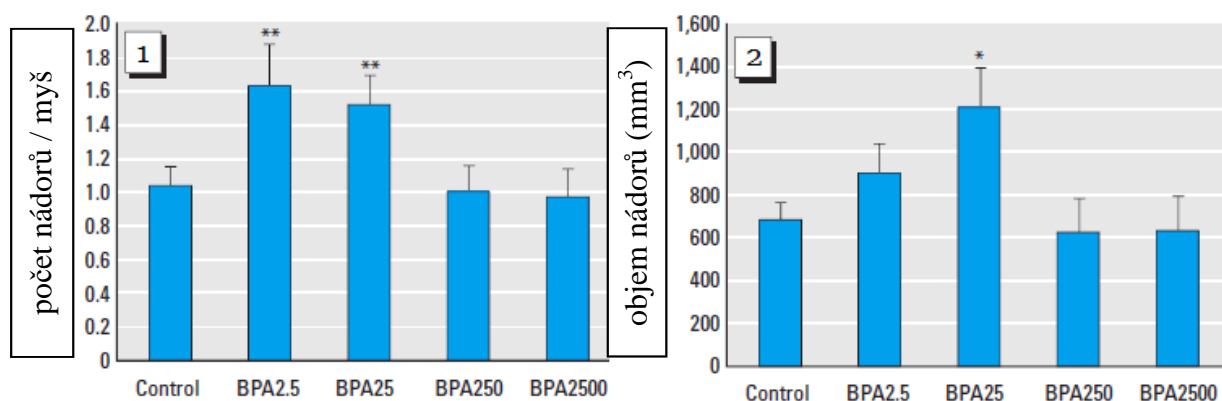
Distribuce obou typů ERs je v organismu rozdílná. Obecně lze říci, že distribuce ER β je v organismu širší než ER α . Oba typy ERs jsou ale zastoupeny v různém poměru v mléčné žláze, děloze a vaječnicích (Benassayag et al., 2002). ER α se nejvíce vyskytují v pohlavní soustavě – v děloze a vaječnicích, konkrétně v buňkách *theca*, intersticiálních buňkách a zárodečném epitelu, ale i v mozku, kostech, játrech nebo tukové tkáni. ER β jsou zastoupeny téměř ve všech tělních soustavách. Jsou přítomné v kostech, plicích, močovém měchýři, mozku, ale také v trávicí (konkrétně ve slinných žlázách nebo tlustém střevu), kardiovaskulární a rozmnožovací soustavě (jsou lokalizovány na vaječnicích jako předchozí, s tím rozdílem, že jsou exprimované i na granulózních buňkách rostoucího folikulu) (Gruber et al., 2002).

Působení ED po vazbě na ER závisí na jeho koncentraci a momentální hladině E2 v organismu, ale i na chemické struktuře ED. Po navázání může ED působit buď agonisticky, takže dojde k aktivaci receptoru a vyvolá biologickou odpověď (často se vyskytuje u rakoviny prsu), nebo antagonisticky, kdy je vazba přirozeného E2 na receptor inhibována. Při navázání ED na receptor estrogenu nemůže dojít k navázání endogenního estrogenu, nedojde tedy k normálnímu průběhu reakce a organismus nereaguje tak, jak by reagoval při vazbě přirozeného estrogenu (Kavlock et al., 1996).

EDs vykazují celou řadu specifických vlastností. Jednou z nich, která je pozorována u většiny EDs je i tzv. „low dose effect“, efekt nízké dávky. Nízké dávky EDs mohou mít paradoxně daleko silnější negativní účinky na organismus než vyšší koncentrace používané v toxikologických studiích (Vandenberg et al., 2012). Koncentrace EDs či hormonů ovlivňuje i množství cílových receptorů v organismu. Tato závislost odpovědi na dávce je nelineární. Křivka této nelinearity se může projevit pozitivně, negativně či vice versa. Tato křivka má tvar písmene U nebo obráceného U (viz Obrázek č. 4). Křivky se nazývají dvoufázové, protože ukazují sestupnou a vzestupnou fázi v závislosti na dávce (Ismail et Nawaz, 2005). Definice nízkých dávek je několik. Za nízkou dávku je považována dávka, která je nižší než ta,

kteřá je obvykle testována v toxikologických studiích. Nelze stanovit pro všechny ED jednotnou hranici pro nízkou dávku, obecně se dávky pohybují v rozsahu nanomolů a mikromolů, některé působí již v pikomolárních dávkách (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Příkladem výše zmíněných fenoménů typických pro EDs může být studie provedená týmem Jenkins et al. (2011), ve které byla u myší testována korelace mezi vznikem nádorů a jejich velikostí a podávání široké koncentrační škály BPA přidávaného do vody (2,5 – 2500 μg BPA / l vody) (viz Obrázek č. 4) (Jenkins et al., 2011).



Obrázek č. 4: Příklad nelineárního efektu BPA u myší. (Převzato z Jenkins et al., 2011).

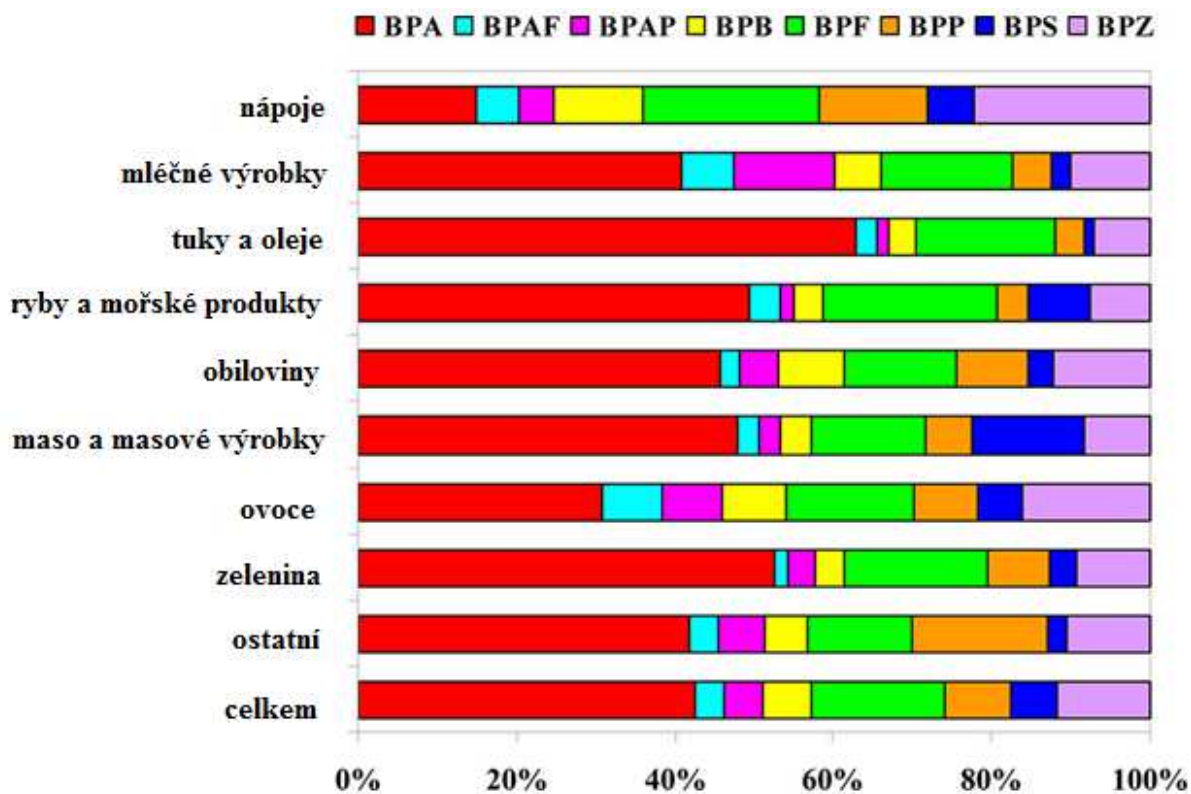
Na mechanismu účinku a důsledcích působení ED se podílí i několik dalších faktorů, jako například věk, ve kterém byl jedinec vystaven ED (Crews et al, 2003). Působení EDs může vzhledem k transplacentárnímu přenosu dojít již od intrauterinního období až do konce života jedince. EDs působí jinak na dospělé jedince a jinak na vyvíjející se plod. Obecně, mláďata jsou vnímavější k chemickým toxinům více než dospělí jedinci, protože jejich schopnost detoxikovat a metabolizovat toxiny je menší, tím dochází k narušení hormonálního, neurologického a imunologického vývoje a jedinec může mít vrozené abnormality a trpět zdravotními problémy. Obecně, novorozenci jsou vnímavější k chemickým toxinům více než dospělí jedinci, protože jejich schopnost detoxikovat a metabolizovat toxiny je menší (Crinnion, 2009). Pokud dojde k expozici během fetálního vývoje nebo v novorozeneckém období, účinek ED se může projevit až za mnoho let. Je tedy důležitá i doba latence od expozice. Mezi dobou expozice a manifestací důsledků způsobených vlivem ED existuje určitá časová prodleva, takže důsledky expozice nemusí být viditelné již v raném věku, ale mohou se projevit až v dospělosti nebo v průběhu stárnutí (Crews et al., 2003). Záleží i na tom, jestli se ED vyskytují ve směsích nebo samostatně, ale pokud jsou organismy vystaveny účinku ED, je pravděpodobné, že v prostředí se vykytují i další polutanty, jen zřídka to bývá

jedna jediná sloučenina. Efekty působení různých tříd ED mohou být aditivní nebo dokonce synergické (vom Saal et al, 2007).

Zdroje expozice EDs jsou různé po celém světě. Na základě experimentů, které prokázaly negativní účinky na organismus u některých z nich, byla organizací EFSA jejich výroba zakázána. Příkladem může být DDT, jehož používání bylo na základě alarmujících negativních účinků popsaných řadou studií zakázáno již před desítkami let, u jiných dochází k regulaci prostřednictvím zákazu jejich použití v některých výrobcích (BPA). Existuje několik historických příkladů, kdy unikly jedovaté látky do prostředí a ukázaly přímou souvislost s poruchami endokrinní a reprodukční soustavy u lidí, ale i u zvířat. Často postižené jsou i průmyslové oblasti, kde dochází ke kontaminaci půdy a podzemních vod (Calafat et Needham, 2007). Pokud jsou zvířata vystavená EDs, dostávají se tyto látky do potravního řetězce a kumulují se v organismech, které živočichy konzumují a jsou zpravidla výše postavení v tomto řetězci (člověk, predátoři). K expozici dochází prostřednictvím pitné kontaminované vody, potravou, zeminou nebo znečištěným vzduchem. Lidé ve styku s pesticidy, fungicidy a průmyslovými chemikáliemi jsou riziku vystaveni nejvíce, vyskytují se u nich reprodukční a endokrinní abnormality (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Známý příklad látky, jejíž použití je na základě výsledků studií regulováno, je bisfenol A (BPA), který se od roku 2011 v Evropské unii nesmí používat v kojeneckých lahvích a o rok později byl zakázán i v dalším spotřebním zboží určeném pro kojence. Někteří výrobci na to reagovali, přestali přidávat BPA do plastových produktů a označili nápisem „BPA - free“. V mnoha případech ale toto označení neznamena, že výrobky jsou bez bisfenolů, protože BPA byl nahrazen BPS (Rochestercorr et Bolden, 2015).

Po zákazu BPA se však musel najít nový analog, který by se mohl ve výrobě používat. Místo BPA se začal využívat jeho strukturální analog z řad bisfenolů - bisfenol S. Vzhledem ke strukturální podobnosti existuje riziko, že používání BPS by mohlo vést k podobným nežádoucím účinkům, jako měl jeho předchůdce (Rosenmai et al., 2014). Kromě BPA a BPS existuje řada dalších jako například bisfenol AF (BPAF), bisfenol AP (BPAP), bisfenol B (BPB), bisfenol E (BPE), bisfenol F (BPF), bisfenol P (BPP), bisfenol S (BPS) a bisfenol Z (BPZ), které jsou využívány v průmyslu a jejich zastoupení ve výrobcích je různé (viz Obrázek č. 5) (Liao et Kannan, 2013).



Obrázek č. 5: Procentuální výskyt bisfenolů v potravinách (Alabany, NY), obiloviny zahrnují i obilné produkty, zelenina a ovoce zahrnuje konzervované produkty. Převzato z: Liao et Kannan, 2013.

3.3.3 Bisfenol A

BPA (2,2-bis-4-hydroxyfenyl-propan) je chemický monomer, který se používá k výrobě polymerových výrobků, jako jsou polykarbonátové plasty a epoxidové pryskyřice. Používá se k výrobě běžných spotřebitelských produktů jako například kosmetika, zubní plomby, hračky, obalové materiály, bankovky a termopapír (). Poprvé byl vyvinut v roce 1890, ale až ve 30. letech minulého století bylo zjištěno, že BPA má estrogení vlastnosti a negativní vliv na reprodukční trakt samců a samic (Calafat et al., 2008). I přesto se BPA stal jedním z nejvíce vyráběných a používaných chemikálií v celém světě. Rychle se rozšířil především kvůli svým vlastnostem, při polymeraci vzniká polykarbonátový plast, což je levný, lehký produkt, který je průhledný, odolný vůči nárazům, vysokým teplotám a chemikáliím, snadno se modeluje a tepelně tvaruje. I přes jeho estrogení vlastnosti je jeho roční produkce větší než 5 milionů tun za rok, z toho se přibližně půl milionu kg ročně uvolní do životního prostředí (Mileva et al., 2014). K uvolnění do prostředí dochází buď přímo

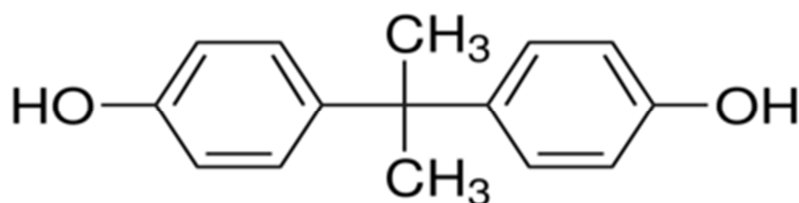
z chemických, plastových výrobků, z recyklačních továren, sléváren nebo nepřímo z výluhu plastů, papíru, odpadů na skládkách nebo odpadních vod, takže přímo ohrožuje i volně žijící zvířata. Molekula BPA má strukturální vlastnosti, které jí umožňují se vázat na estrogenové receptory, tím inhibuje aktivitu přirozených endogenních estrogenů, podobně jako řada EDs (Kitamura et al., 2005).

Stejně jako jiné chemické látky, může se BPA uvolnit z materiálů, ve kterých je obsažen, závisí na teplotě a pH. Následně může BPA migrovat do potravin, nápojů, vzduchu, slin, krve a kůže, kde může být posléze detekován (Geens et al., 2012). Často dochází ke kontaminaci potravin a nápojů v plechovkách, obsahují uvnitř totiž vrstvu s BPA, která zabraňuje přímému styku potravin nebo nápojů s plechovkou (Vandenberg et al., 2007). Člověk se tedy do kontaktu s BPA dostane nejčastěji prostřednictvím kontaminovaných potravin a pitné vody, ke kontaminaci dochází migrací BPA z obalových materiálů, ve kterých se nachází. Dochází ale i k penetraci přes kůži z kosmetických výrobků nebo termálního papíru, případně inhalací prachových částic (Huang et al., 2012). Ukazuje se, že 90% z celkové expozice BPA tvoří právě zmiňované potraviny, zatímco expozice vdechnutím, prostřednictvím zubní chirurgie nebo kožní absorpce je nižší než 5% (Geens et al., 2012).

Celkové koncentrace byly naměřeny u 92,6% vzorků moči u Američanů, 90% Kanadčanů (Bushnik et al., 2010) a u více než 90% populace sedmi asijských zemí, což poukazuje na to, že drtivá většina populace byla vystavena účinkům BPA (Chou et al., 2011). Řada studií tedy prokázala přítomnost BPA v lidských tkáních a tekutinách, nejčastěji kormě moči, byla jeho přítomnost zjištěna i v krevním séru, v reprodukční tkáni – především ve varleční tkáni a semenné tekutině (Manfo et al., 2014), folikulární tekutině, mateřském mléku, fetální plasmě, plodové vodě a placentě, dále v pupečnickové krvi, takže plod je působení BPA vystaven také (Chou et al., 2011). Existuje zde riziko přímé souvislosti mezi expozicí matky a úrovně BPA u plodu. BPA prostupuje placentou a tím ovlivňuje vývoj plodu. Novorozenci mohou být vystaveni působení BPA i během kojení v důsledku přítomnosti BPA v mateřském mléce (Mendonca et al., 2014). Nejvyšší hladiny byly zjištěny u dětí a mládeže, nižší u dospělých jedinců, toto zjištění je velmi znepokojující, protože děti mají zvýšenou citlivost na endokrinní účinky BPA (Calafat et al., 2008).

BPA napodobuje činnost E2 a působí skrze estrogenové receptory, ke kterým ale vykazuje 1000 – 2000x nižší afinitu než E2 (Bulli et al., 2010). BPA se váže k oběma typům ERs. Nicméně vyšší afinitu vykazuje k ER α než ER β (Caserta et al., 2014). Rovnováha mezi

ER α a ER β je udržována pomocí E2, který kontroluje buněčnou smrt a proliferaci. Signály zprostředkované skrze ER α , vedou k proliferaci, zatímco signály z ER β proliferaci inhibují. Pokud jsou buňky vystaveny BPA, dochází k jeho vázání na ERs, v přítomnosti ER α působí BPA proliferačně, v přítomnosti ER β působí jako kompletní antagonist komplexu E2 / ER β . BPA tedy podporuje proliferaci a působí proti apoptóze. Aktivita ER β není nijak vyvážená, čímž je rovnováha narušena a může vést k transformaci v rakovinotvorné buňky (Bolli et al., 2010). Bylo zjištěno, že BPA působí jako antagonist androgenních receptorů a po expozici BPA *in vivo* dochází ke snížení syntézy testosteronu a E2 (Kitamura et al., 2005).



Obrázek č. 6: Vzorec bisfenolu A. Zdroj:[https://cs.wikipedia.org/wiki/Bisfenol_A#/media/File: Bisphenol_A.svg](https://cs.wikipedia.org/wiki/Bisfenol_A#/media/File:Bisphenol_A.svg).

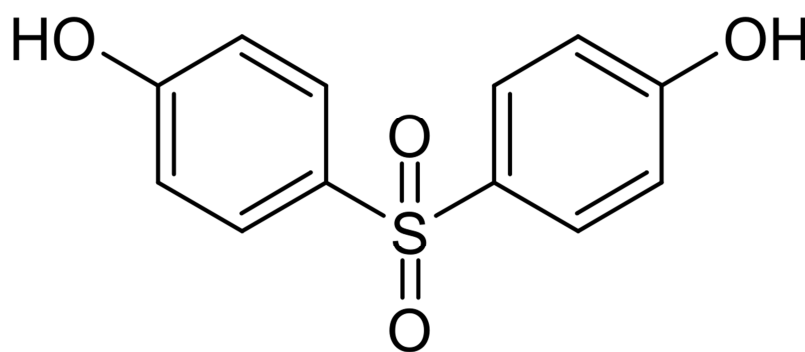
3.3.4 Bisfenol S

Bisfenol S (BPS, 4,4'-sulfonyl difenol) se začal používat jako bezpečnější alternativa BPA, i přesto, že jeho účinky, co by potenciálního endokrinního disruptoru, nejsou zcela prozkoumány a data o účincích BPS jsou velmi omezená. Jedná se o novou látku, která ještě není dostatečně legislativně regulovaná, na rozdíl od BPA (Ullah et al., 2016). Jedná se o strukturální analog BPA tvořící monomer, ze kterého se vyrábí epoxidová pryskyřice a cyklické karbonáty. Přidává se i jako přísada do pesticidů nebo barviv. BPS je ve srovnání s BPA chemicky stabilnější, je hůře biologicky odbouratelný a v organismu působí delší dobu a navíc více nebezpečným způsobem. Kromě toho, BPS i lépe penetruje přes kůži než BPA (Liao et al., 2012). BPS má vynikající stabilitu při vysokých teplotách, je odolný vůči slunečnímu záření. Stejně jako ostatní EDs, má i BPS fenolickou skupinu, která je toxická a vážně ohrožují zdraví organismu (Chen et al., 2002).

Z výše uvedeného vyplývá, že BPS by mohl vykazovat negativní účinky na organismus, podobně jako je tomu u BPA a na základě toho se dostal do popředí zájmů vědeckých týmu, které začali intenzivně studovat jeho vliv na organismus a jeho vlastnosti. I u BPS byla prokázána estrogenní aktivita, schopnost napodobit vlastnosti hormonů a vázat se na ER. *In vitro* experimenty prokázaly silnou estrogenní aktivitu BPS, zatímco k jaderným

ER má BPS nižší estrogenní účinnost ve srovnání s E2, k membránovým receptorům vykazuje BPS stejnou nebo dokonce vyšší estrogenní účinnost než E2 (Rosenmai et al., 2014). Estrogenní aktivita byla také prokázána postnatálně *in vivo* u krys, které byly vystaveny BPS a docházelo u nich k růstu děložní tkáně (Owens et Ashby, 2002). BPS má tedy prokazatelný nebezpečný estrogenní potenciál *in vivo*. Kromě toho u něj byla prokázána, stejně jako u BPA, i androgenní a anitandrogenní aktivita (Kitamura et al. 2005). V několika pokusech se ukázala i jeho cytotoxická a mutagenní aktivita, má i potenciálně škodlivé účinky na genetický materiál a indukuje apoptózu tím, že narušuje buněčnou signalizaci (Lee et al., 2013). Vzhledem k tomu, že BPS je látka velmi podobná BPA a ukazuje si i její analogický mechanismus účinku *in vitro*, dá se očekávat, že bude mít i podobné cíle a mechanismy účinku (Ullah et al., 2016).

Výroba a poptávka po BPS se neustále zvyšuje (především v Číně) a vzhledem k jeho rozšířenému používání je člověk dennodenně vystaven účinkům BPS. Přítomnost BPS v organismu byla prokázána u velké většiny populace v ekonomicky rozvinutých zemích, v důsledku toho, že BPS se v současnosti vyskytuje téměř ve všech spotřebních výrobcích, kde nahradil BPA. BPS v lidské moči byl prokázán u 81% populace ze 7 asijských zemí a USA (Liao et al., 2012). Přítomnost BPS byla prokázána v konzervovaných potravinách (Vinas et al., 2010), v prachu v domácnostech a v povrchové i odpadní vodě. BPS se do organismu nejčastěji dostává přes kůži, inhalací prachu a skrze potraviny (Liao et al., 2012)



Obrázek č. 7: Vzorec bisfenolu S. Zdroj: https://en.wikipedia.org/wiki/Bisphenol_S#/media/File:Bisphenol_S.svg

3.4 Vliv BPA na samičí pohlavní soustavu

Vývoj a funkce samičího pohlavního systému jsou závislé na koordinovaných biologických procesech. Jejich narušení endogenními nebo exogenními faktory v prenatální a

postnatální fázi života může mít výrazně negativní dopady na zdraví samců i samic, stejně jako ovlivnění reprodukčních funkcí (Diamanti-Kandarakis et al, 2009).

Mezi výše zmíněné exogenní faktory bezesporu patří i EDs, včetně BPA a obavy z dopadu těchto environmentálních polutantů na lidskou i zvířecí reprodukci rostou. Roste počet laboratorních studií provedených na hlodavcích, primátech, a kopytnících, které podporují názor, že EDs jsou původci některých reprodukčních poruch u samic. EDs působí na reprodukční systém samic, ale i samců (McLanchlan et al., 2006).

U BPA byly pozorovány negativní účinky na celou reprodukční soustavu a na fertilitu. Velký počet studií dokazuje, že BPA může působit jako toxická látka v reprodukci, v experimentálních studiích bylo prokázáno, že BPA má negativní vliv na dělohu a vaječníky, dále také na oocyty, na nástup pohlavního cyklu a vliv na pohlavní zralost (Rubin, 2011). BPS měl být bezpečnější variantou BPA, ale mnohé studie tomu nenasvědčují, mimo to, *in vitro* způsobuje oxidační stres a vykazuje endokrinní potenciál *in vivo*. Údaje o BPS jsou omezené, studií bylo provedeno jen málo (Ullah et al., 2016).

3.4.1 Hypotalamický systém

Hypotalamus společně s hypofýzou tvoří systém, který je nadřazen celé řadě žláz s vnitřní sekrecí (např. vaječníky) a zprostředkovává důležité interakce mezi nervovým a endokrinním systémem. Důležitým hormonem hypofýzy je GnRH, který je rozhodující pro normální reprodukční funkce obratlovců, tím že stimuluje uvolňování FSH a LH z předního laloku hypofýzy, tím reguluje gonadální funkce (Harrison et al., 2004). BPA však může způsobit vývojové a funkční defekty hypotalamického systému a celé hypotalamo – hypofyzárně – gonadální osy, protože ERs jsou exprimovány v celé této ose. Může to vést k problémům v reprodukci, jak v pubertě, tak i po dosažení pohlavní dospělosti (Tena-Sempere, 2010). U potkanů vystavených BPA byla zaznamenána nevratná změna v hypotalamo – hypofyzárně – gonadální ose, vedla k anovulaci a neplodnosti samic potkanů. Mechanismus je nejspíše zprostředkován přes kisspeptiny, které řídí sekreci GnRH (Fernández et al., 2010).

Vystavení hypotalamu účinkům BPA může mít za následek i změnu hladinu hormonů. Změřené hladiny LH, které jsou tedy indukované GnRH, byly u kryš vystavených BPA nižší, než u kontrolních kryš. Navíc frekvence pulzů GnRH byla vyšší, předpokládá se, že to způsobuje nižší citlivost hypofýzy, což vede ke snížení sekrece LH. Prepubertální expozice BPA také ukázala snížení pulzní frekvence LH u ovcí. BPA snižuje aktivaci MAPK, což dále

ovlivňuje expresi receptoru GnRH. Snížená exprese tohoto receptoru v hypofýze může být mechanismem, který snižuje uvolňování LH (Fernández et al., 2009).

3.4.2 Děloha, vejcovody a placenta

Několik studií prokázalo negativní vliv BPA na dělohu. Bylo zaznamenáno snížení proliferace děložního epitelu během estrálního cyklu potkanů (Mendoza-Rodriguez et al., 2011). U zvířat, která byla účinku BPA vystavena neonatálně, byly pozorovány změny na morfologii dělohy dospělých samic potkanů. Nízké dávky BPA vyvolávají maligní a benigní léze a vyvolávají vznik endometriálních polypů na děloze (Newbold et al., 2009). Koncentrace BPA má souvislost i s výskytem endometriozy, BPA obecně zhoršuje proliferaci buněk v děloze. U hlodavců došlo po expozici BPA ke snížené expresi děložních ER α . Dochází tedy ke snížení receptivity dělohy a snížení počtu míst, kam je možné provést implantaci při IVF, v lidských studiích toto však prokázáno nebylo (Berger et al., 2010).

Vliv BPA na vejcovod je prozkoumán jen v několika málo studiích, ale ve všech byly prokázán výskyt patologických proliferujících lézí ve vejcovodu u dospělých samic, které byly prenatalně vystaveny nízkým dávkám BPA. Vzhledem k morfologickým změnám vejcovodu se dá očekávat, že negativně ovlivní oplození i přesun embrya do dělohy (Newbold et al., 2009; Newbold et al., 2007).

Vliv BPA na vejcovod je prozkoumán jen v několika málo studiích, ale všechny pozorovaly progresivní proliferální léze ve vejcovodu u dospělých jedinců, kteří byli prenatalně vystaveni nízkým dávkám BPA. Vzhledem k morfologickým změnám vejcovodu se dá očekávat, že negativně ovlivní oplození i přesun embrya do dělohy. BPA negativně působí i na samotnou dělohu. U zvířat, která byla účinku BPA vystavena neonatálně, se vyskytuje narušení hrubé morfologie dělohy u dospělých samic. Nízké dávky BPA vyvolávají maligní a benigní léze a polypy endometria dělohy (Newbold et al., 2009).

Účinky BPA se projevují i na proliferaci buněk placenty. Nízké dávky vedou ke zvýšení apoptózy a snížení proliferace kultivovaných buněk trofoblastu *in vitro*, vyšší dávky potom ke snížení životaschopnosti buněk (Morice et al., 2013) a BPA má schopnost měnit i genovou expresi buněk v placentě (Susiarjo et al., 2013).

3.4.3 Vaječníky a oocyty

Vaječníky jsou klíčovým orgánem pro reprodukční a hormonální funkce samic a BPA je narušuje v celé řadě aspektů. Vystavení ovárií účinkům BPA, je často spojováno s atrezií

folikulu, tím pádem se snižuje celkový počet Graafových folikulů (Souter et al., 2013). Studie provedené na ženách prokázaly pozitivní korelaci mezi hladinou BPA v krevním séru a naměřenou hladinou testosteronu a androstendionu. BPA tedy stimuluje vaječníky k produkci testosteronu (Kandaraki et al., 2011). U ovcí a makaků prenatalně vystavených účinkům vysoké hladiny testosteronu, docházelo k fetálnímu programování syndromu polycystických ovárií (Dumesic et al., 2007). Tento syndrom se často vyskytuje u žen. Jedná se o stav charakterizovaný přetrvávající anovulací bez přítomnosti nemoci štítné žlázy, nadledvinek nebo hypofýzy, kdy se na vaječnicích hromadí malé antrální folikuly. U žen, kterým byl v krvi detekován BPA, bylo zaznamenáno zvýšení výskytu tohoto syndromu (Azziz et al., 2006). U novorozených potkanů vystavených BPA se tento syndrom vyvinul v dospělosti (Fernández et al., 2010). V další studii provedené na mladých dívkách byla expozice BPS spojena se zvětšením objemu vaječníků (Qiao et Feng., 2010).

Vliv BPA na vaječníky se projevuje i snížením kvality oocytů zvířat i lidí. Několik vývojových etap oocytů je citlivých na expozici BPA, jedná se o období nástupu meiozy na vaječnicích plodu, perinatální vývoj folikulu a znovuzahájení meiozy v dospělosti. Expozice samic myší BPA ve fetálním období má za následek nepříznivé účinky na ranou oogenezi, dochází k narušení meiozy, zvýšení počtu synaptických vad (neúplné synapse chromozomů) a poruchám rekombinace. Tyto odchylky se však vyskytly, až když plod dosáhl dospělosti (Machtinger et Orvieto, 2014). BPA ovlivňuje zahájení meiozy v preovulačním oocytu, a neonatální vystavení nízkým dávkám BPA inhibuje GVBD u samic myší (Chao et al., 2012).

BPA ovlivňuje i utváření dělicího vřeténka v oocytu, což může mít za následek neschopnost chromozomů se na něj navázat a úspěšně pokračovat v meióze. V *in vitro* studiích, BPA výrazně měnilo utváření dělicího vřeténka a distribuci pericentriolárního materiálu na pólech vřeténka u antrálních folikulů (Eichenlaub-Ritter et al. 2008). V oocytech nacházejících se ve folikulech u dospělých myší, došlo díky expozici BPA k narušení uspořádání dělicího vřeténka a meiotickému bloku po GVBD ale před vydělením pólového tělíska (Lenie et al., 2008). BPA také indukuje chybný rozestup chromozomů při meióze, u makaků byly prokázány zásadně narušené synapse a rekombinace mezi homologními chromozomy v době zahájení meiozy (Vandenberg et al., 2010). Při vystavení myších oocytů BPA *in vitro* nebo během vývoje plodu, bylo zaznamenáno nesprávné seřazení chromozomů do ekvatoriální roviny ve druhé metafázi, navíc oocyty vystavené BPA v průběhu meiotického zrání jsou v případě oplození náchylnější k potratu (Hunt et al., 2003). U myší a makaků docházelo i ke změnám genové exprese v kmenových buňkách (Lawson et al., 2011).

BPA má vliv i na úspěšnost IVF, protože existuje vztah mezi koncentracemi BPA v moči a počtem získaných oocytů v rámci IVF, jejich zráním a fertilizací. Zvyšující se koncentrace BPA v moči byla spojena se sníženým počtem získaných oocytů, zralých oocytů (MII) a normálně oplozených oocytů (PN2) (Ehrlich et al. 2012).

BPA nemá vliv jen na oocyty, ale působí i na samotné folikuly. Expozice BPA vede totiž k urychlení vývoje folikulu u několika živočišných druhů. U neonatální expozice jehňat došlo k urychlení přeměny folikulů, snížil se počet primordiálních folikulů a zvýšil se počet primárních folikulů. Ve studii na neonatálně exponovaných jehňatech se vyskytly multioocytární folikuly (Rivera et al., 2011), i u makaků se vyskytly sekundární a antrální folikuly s více oocyty. Nízké dávky BPA mění utváření folikulů, ale vyšší dávky inhibují růst nebo způsobují atrezii a vyvolávají změny v genové expresi u hlodavců v antrálním folikulu (Hunt et al., 2012).

3.5 Vliv BPS na pohlavní soustavu

I přesto, že se BPS vyskytuje v životním prostředí i v biotě, je velmi omezené množství informací o vlivu BPS na endokrinní i reprodukční systém. Většina studií je provedena na nižších živočiších – daniu pruhovaném (*Danio rerio*). U hrotnatek velkých (*Daphnia magna*) bylo prokázáno, že BPS je pro ně akutně toxický a obecně má estrogenní a antiandrogenní aktivitu (Chen et al., 2002). Reprodukční procesy u ryb jsou regulovány koordinovanými interakcemi mezi steroidními hormony hypotalamo – hypofyzárně - gonadální osy a steroidogenezí v gonadální tkáni (Ma et al., 2002). Z tohoto důvodu mohou látky znečišťující životní prostředí ovlivnit expresi steroidogenních genů, koncentrace hormonů pocházejících z této osy by mohla mít vliv na funkci endokrinního systému a reprodukci ryb. U BPS zatím nebyly potenciální účinky na transgenerační toxicitu doposud objasněny, na rozdíl od BPA (Ji et al., 2013).

Podle studií, BPS způsobuje reprodukční dysfunkce a mění plazmatické hladiny pohlavních hormonů i genovou transkripci v hypotalamo – hypofyzárně – gonadální ose u dospělých jedinců danií. Regulace genů receptorů pro GnRH (*ghnr1*, 2, 3) u samců danií naznačuje, že by BPS mohl modulovat koncentraci GnRH u ryb, které by následně mohly mít vliv na produkci gonadotropních hormonů. U obratlovců má GnRH klíčovou roli v regulaci reprodukce prostřednictvím hypotalamo – hypofyzárně – gonadální osy (Schally et al., 1971). Dánia mají dva typy GnRH (GnRH2 a GnRH3) a čtyři různé receptory pro GnRH. Regulace

genů receptorů pro FSH a LH u samců dání by mohla podle studie nepřímo ovlivnit gonadotropní hormony (Tello et al., 2008).

BPS má vliv i na hladiny určitých pohlavních hormonů. V několika studiích byla u BPS zaznamenána výrazně vyšší produkce E2 a menší produkce testosteronu u samců po expozici BPS. Ke stejnému výsledku se došlo i u BPA. Zajímavé je, že nežádoucí účinky BPS na hladinu hormonů a genovou expresi byly závislé na pohlaví. Samci jsou mnohem citlivější než samice. U samic sice došlo ke zvýšení E2, ale žádné výrazné změny v plasmatických koncentracích testosteronu a gonadální transkripce genů nebyly zaznamenány (Ji et al., 2013). Studie Naderi et al. (2014) dokazuje, že BPS má vliv i na pohlaví. Při vystavení dání po dobu 75 dnů nízkým dávkám BPS došlo ke změně poměru pohlaví ve prospěch samic. Docházelo i ke zkracování délky těla a hmotnosti u samců, měli sníženou hladinu testosteronu.

Změny hladin pohlavních steroidních hormonů mohou způsobovat reprodukční dysfunkce tím, že manipulují s regulačními mechanismy hypotalamo – hypofyzárně – gonadální osy (Xi et al., 2011). Tato hypotéza byla potvrzena ve studii, kdy změněné plasmatické hladiny E2 byly doprovázeny výrazně sníženou produkcí vajíček u dání vystavených nízkým hladinám BPS (0,5 µg / l). U střevle potoční také dochází k inhibici produkce vajíček, jen při daleko vyšších koncentracích BPS (1280 µg / l) (Sohoni et al., 2001). I u hád'átka obecného (*Caenorhabditis elegans*) byl po expozici BPS snížen počet vajíček (Chen et al., 2016). Expozice BPS je tedy spojena se změnami regulace pohlavních hormonů v hypotalamo – hypofyzárně – gonadální ose, tyto změny jsou pravděpodobně důsledkem toho, že BPS funguje jako agonista ER (Sanderson, 2006).

Byl pozorován významný pokles hmotnosti reprodukčních orgánů při koncentracích, které se běžně vyskytují v životním prostředí. BPS tedy inhibuje růst gonád (Zhang et al., 2011). Pokud byly rodičovské páry dání vystaveny koncentracím BPS odpovídajícím těm v prostředí, docházelo k opožděnému líhnutí a zvýšenému výskytu malformací potomků. Toto koreluje i s výsledky zjištěnými u BPA u pstruha duhového (Aluru et al., 2010).

4 Materiály a metodika

4.1 Získávání ovárií

Vaječníky byly odebírány z mladých prasniček (ve věku 7 až 8 měsíců) poražených na jatkách. Prasničky jsou v neznámé fázi estrálního cyklu. Po odběru byly vaječníky uchovávány v termosce při teplotě 39 °C, a co nejrychleji byly přepraveny do laboratoře.

4.2 Izolace a výběr oocytů

Aspirace oocytů probíhala pomocí injekční jehly 20G. Takto byla získávána folikulární tekutina z ovariálních folikulů velkých 2 – 5 mm, která byla následně nalita do Petriho misky a pod binokulární lupou byly získané oocyty i s kumulárními buňkami vybírány pomocí skleněné pipety do manipulačního média TL – HEPES. Pro experiment byly vybrány jen oocyty splňující následující podmínky:

- oocyt dosahuje velikosti 120 μm
- vrstva kumulárních buněk obklopujících oocyt je kompaktní
- cytoplasma je neporušená a vyplňuje celý oocyt.

4.3 Kultivace a příprava kultivačního média

Kultivace oocytů s kumulárními buňkami probíhala v kultivačních miskách, které mají čtyři důlky (Nunc, Roskilde, Dánsko). Oocyty byly kultivovány v 1 ml kultivačního média M199 (složení viz Tabulka č. 1). Misky byly následně uloženy do termoboxu při konstantních podmínkách – teplota 39 °C a směs 5 % CO₂ se vzduchem a kultivovány *in vitro* 24, resp. 48 hodin. Před samotnou kultivací bylo medium doplněno o růstový faktor (Sigma - Aldrich, GibcoBRL, Life Technologies, UK) a 13,4 IU eCG : 6, 6 IU hCG / ml (P. G. 600 Intervet Boxmeer, Holandsko). Kontrolní skupina byla kultivována v čistém médiu, do experimentálních skupin byl ještě přidán přípravek BPS (Sigma – Aldrich, MO, USA) rozpuštěný v dimethylsulfoxidu (DMSO) v příslušné koncentraci. Finální koncentrace BPS v kultivačním médiu byly 3 nM, 300 nM a 30 μM .

Tabulka č. 1: Složení modifikovaného kultivačního média M199

Složení modifikovaného kultivačního média M199	
Složka	Dávka na 100 ml média M199
Pyruvát sodný (Sigma - Aldrich, Německo)	25 mg
Laktát sodný (Sigma - Aldrich, Německo)	60 mg
HEPES (Sigma - Aldrich, Německo)	150 mg
Gentamicin (Sigma – Aldrich, Německo)	2, 5 mg

4.4 Imunocytochemie

Po 24, rep. 48 hodinové kultivaci byly oocyty zbaveny kumulárních buněk pomocí tenkostěnné skleněné pipety, nebo opakujícím se pipetováním. Následně byla odstraněna *zona pellucida* 0,5 % pronázou (Sigma - Aldrich, MO, USA). Poté byly oocyty 4x propláchnuty v TI – HEPES – PVA (složení viz Tabulka č. 3), přemístěny do 400 μ l PBS – NaN₃ (složení viz Tabulka č. 2) a fixovány v 4 % formaldehydu v PSB - NaN₃ po dobu 40 minut.

Dále byly oocyty 2x propláchnuty v PBS - NaN₃. Následovalo blokování oocytů v 5% NGS (normal goat serum - kozím sérum, G9023, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) s 0,1 % TritonX – 100 v PBS - NaN₃ (složení Tabulka č. 2) po dobu 25 minut. Oocyty byly inkubovány v primární protilátce anti ER β ředěné 1:200 (ab3579, Abcam) po dobu 1 hodiny při 39 °C. Potom byly 2x propláchnuty v 1 % NGS s 0,1 % TritonX – 100 v PBS - NaN₃. Negativní kontrola oocytů byla inkubována pouze v čistém 1 % NGS s 0,1 % TritonX – 100 v PBS - NaN₃. Oocyty byly poté inkubovány se sekundární protilátkou anti králičí IgG – FITC (fluorescein isothiocyanate) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 1:200) po dobu 40 minut ve tmě. Po dvojitým proplachu v 1 % NGS s 0,1 % TritonX – 100 v PBS- NaN₃ byly oocyty namontovány s Vectashieldem obsahujícím DAPI na teflonové podložní sklíčko a vyhodnoceny pod invertovaným fluorescenčním mikroskopem Ti – U (Nikon, Japonsko).

Tabulka č. 2: Složení PBS - NaN₃

Složení PBS - NaN ₃	
Složka	g / 1000 ml
NaCl	8,00
KCl	0,20
KH ₂ PO ₄	0,26
Na ₂ HPO ₄	1,1
NaN ₃	0,5

Tabulka č. 3: Složení oplachovacího média TI – HEPES – PVA

Složení oplachovacího média TI – HEPES – PVA	
Složka	g / 1000 ml
NaCl	6,6633
KCl	0,2386
NaH ₂ PO ₄	0,0408
Na Lactate (L7900, S-A)	1,4 ml
MgCl ₂ •6H ₂ O	0,1017
HEPES	2,3830
Na Pyruvate	0,0220
Sorbitol	2,1860
NaHCO ₃	0,1680
CaCl ₂ •2H ₂ O	0,2940
Gentamicin (G1264, S-A)	0,0250
Penicillin G (PENK, S-A)	0,0650
PVA	0,1000

4.5 Analýza obrazu

Snímky byly pořízeny prostřednictvím invertovaného mikroskopu Ti – U (Nikon, Japonsko) s kamerou Clara Interline CCD (Andor Technology PLC, Severní Irsko) a vyhodnocovány v programu NIS Elements Ar verze 4.50 (Laboratory Imaging, Czech Republic). Negativní kontrola byla inkubována bez primární protilátky a byla podle ní nastavena expozice mikroskopu, která byla při každém snímání stejná. Od snímků byla odečtena naměřená intenzita fluorescence negativní kontroly (nespecifická vazba). Následně byla provedena analýza obrazu a změřeny intenzity fluorescence pomocí programu Nis Elements 4.50.

4.6 Statistická analýza

Data byla vyjádřena jako \pm SEM (střední chyba průměru), ve třech opakováních, kdy v každé skupině bylo minimálně 20 oocytů. Získaná data byla analyzována prostřednictvím generálních lineárních modelů (GLM) v softwaru SAS (SAS, Institute, USA). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami byly vyjádřeny pomocí Schéffeho testu, hladina významnosti byla stanovena $P < 0,05$.

4.7 Design experimentů

4.7.1 Experiment č. 1

Distribuce ER β v prasečích oocytech během meiotického zrání

Cílem experimentu bylo prokázat, vliv BPS na distribuci ER β v prasečích oocytech během meiotického zrání. K získání výsledků byl použit postup imunocytochemie. K této analýze byly použity oocyty kultivované *in vitro* 24 a 48 hodin v přítomnosti příslušné koncentrace BPS. V každé skupině bylo testováno minimálně 20 oocytů.

4.7.2 Experiment č. 2

Expres ER β v oocytech během meiotického zrání

Cílem experimentu bylo kvantifikovat relativní intenzitu fluorescence ER β v prasečích oocytech během meiotického zrání po 24 a 48 hodinové kultivaci *in vitro*. Kvantifikace byla provedena metodou analýzy obrazu v programu Nis Elements 4.50 na oocytech kultivovaných 24, resp. 48h *in vitro* s přidavkem příslušné koncentrace BPS ze snímků pořízených v experimentu č. 1. V každé skupině bylo testováno minimálně 20 oocytů.

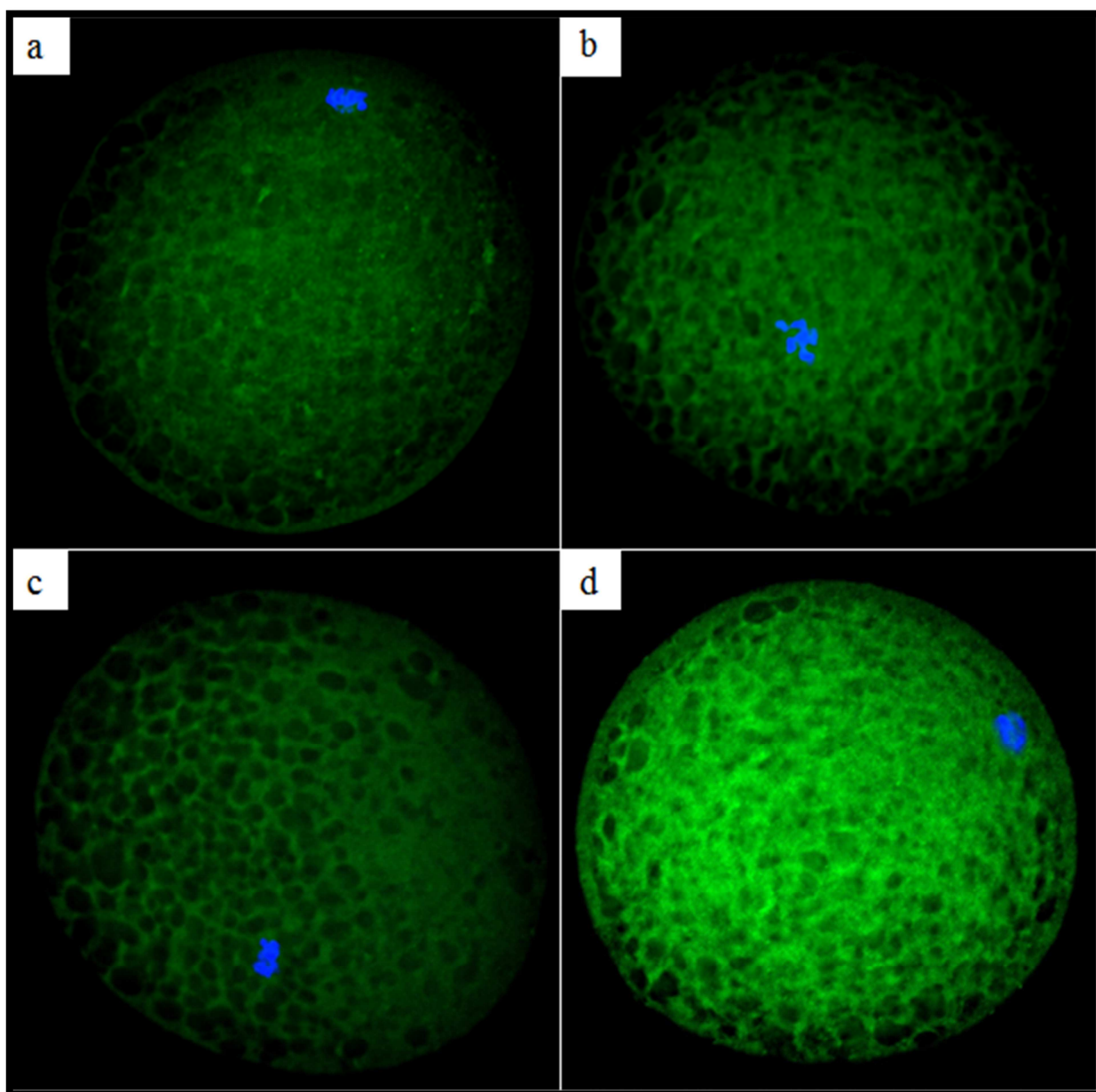
5 Výsledky

5.1 Distribuce ER β v oocytech během meiotického zrání

Cílem prvního experimentu bylo zjistit vliv BPS na distribuci ER β v prasečích oocytech během meiotického zrání, po 24 a 48 hodinové kultivaci *in vitro*. V experimentálních skupinách byla použita primární specifická protilátka, kontrolní skupina oocytů byla inkubována bez této primární protilátky.

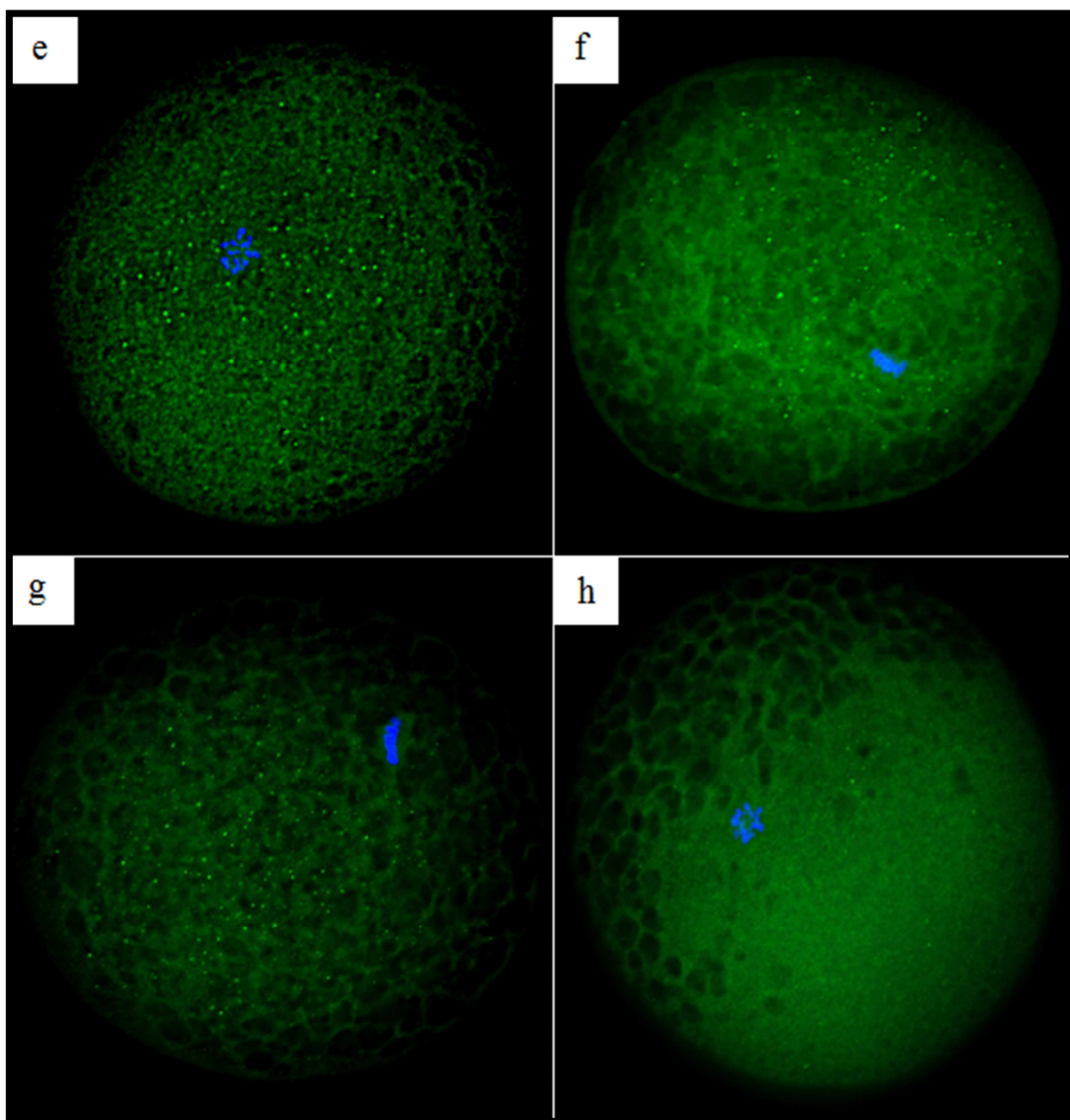
V průběhu celého meiotického zrání docházelo ke změně lokalizace ER β v oocytech kultivovaných *in vitro* v přítomnosti BPS.

Po 24 hodinové kultivaci oocytů byly zaznamenány změny v distribuci ER β ve všech experimentálních skupinách BPS ve srovnání s kontrolní skupinou. U kontrolní skupiny oocytů MI byly ER β lokalizovány rovnoměrně v cytoplasmě i na membráně oocytu. Koncentrace 3 nM BPS se projevila redistribucí ER β více ke středu, v korové oblasti se receptory vyskytovaly nepravidelně a na membráně nebyly distribuovány vůbec, na rozdíl od předchozí skupiny. U oocytů kultivovaných s 300 nM BPS byly ER β rozmístěny asymetricky, často k jednomu okraji oocytu. Při kultivaci oocytů v koncentraci 30 μ M BPS byly receptory rozmístěny podobně jako u koncentrace 3 nM, jen zasahovaly více k okrajům, byly více homogenní a došlo k jejich redistribuci i na membránu (viz Obrázek č. 8).



Obrázek č. 8: Imunocytochemická lokalizace ER β u oocytů kultivovaných *in vitro* po dobu 24 hodin: a – kontrolní skupina oocytů MI, b – 3 nM BPS, c – 300 nM BPS, d -30 μ M BPS. DAPI (modře) – chromatin, FITC (zeleně) – ER β .

I po 48 hodinové kultivaci oocytů byla zaznamenána redistribuce ER β ve všech experimentálních skupinách BPS oproti kontrolní skupině. V kontrolní skupině oocytů ve stádiu MII byly ER β distribuovány rovnoměrně po celém oocytu, okolo středu oocytu byla viditelná výrazná ložiska ER β . V oocytech kultivovaných s 3 nM BPS docházelo k redistribuci ER β směrem k membráně. U koncentrace 300 nM BPS nebyly ER β lokalizovány na membráně, ale byly koncentrovány více do středové části, kde se nacházely i výrazné spoty těchto receptorů. U nejvyšší koncentrace 30 μ M BPS byly receptory soustředěny často asymetricky k jednomu okraji oocytu. Zatímco v kontrolní skupině oocytů a experimentálních skupinách (3nM a 300nM BPS) byly patrné spoty ER β , v nejvyšší použité koncentraci BPS (30 μ M) byla distribuce ER β homogenní (viz Obrázek č. 9).



Obrázek č. 9. Imunocytochemická lokalizace ER β u oocytů kultivovaných *in vitro* po dobu 48 hodin: a – kontrolní skupina oocytů MI, b – 3 nM BPS, c – 300 nM BPS, d -30 μ M BPS. DAPI (modře) – chromatin, FITC (zeleně) – ER β .

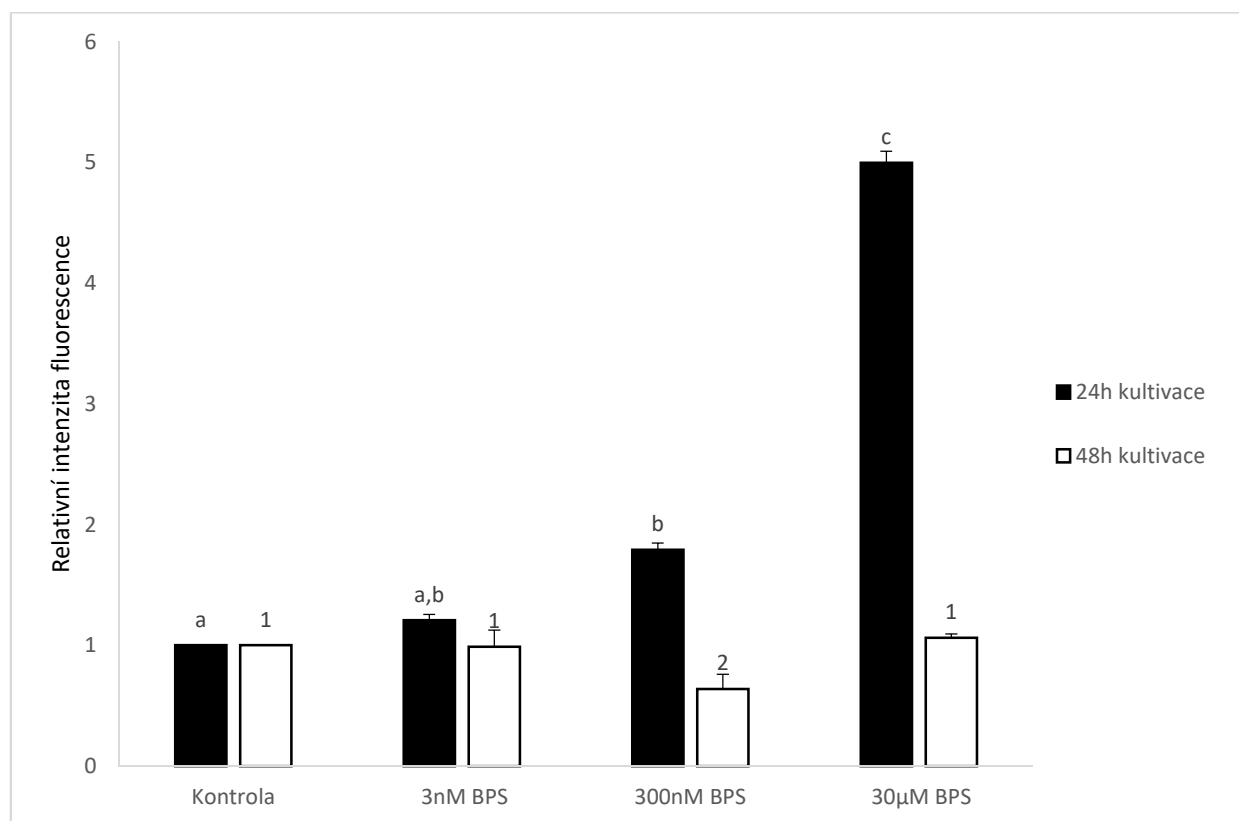
Lokalizace ER β v průběhu meiotického zrání, po 24 a 48 hodinách kultivace *in vitro*, se lišily mezi jednotlivými testovanými koncentracemi BPS. Po 24 či 48 hodinách kultivace *in vitro* došlo vlivem některých koncentrací BPS k redistribuci ER β na membránu. Zatímco u nejvyšší koncentrace – 30 μ M BPS byla tato redistribuce pozorována po 24h hodinové kultivaci, u nejnižší koncentrace k tomu samému docházelo až po 48hodinách. Zároveň se objevovala asymetrická distribuce ER β v oocytech nezávisle na dávce BPS a délce kultivace

– u koncentrace 300 nM BPS po 24h, u 30 μ M BPS po 48h kultivace. Celkově, u 24 hodinové kultivace nebyly tolik viditelné výrazné spoty ER β , jako tomu bylo u většiny oocytů kultivovaných po dobu 48 hodin. I homogenita rozmístění receptorů byla větší u skupiny oocytů kultivovaných *in vitro* po dobu 48 hodin.

5.2 Exprese ER β v oocytech během meiotického zrání

Cílem experimentu bylo zjistit vliv BPS na expresi ER β v prasečích oocytech během meiotického zrání po 24 a 48 hodinové kultivaci *in vitro*. Množství ER β v oocytech v průběhu meiotického zrání bylo kvantifikováno pomocí analýzy obrazu oocytů po imunocytochemické analýze. Hodnoty byly vyjádřeny jako relativní intenzita fluorescence ER β .

Během meiotického zrání docházelo ke změně relativní intenzity fluorescence u oocytů kultivovaných *in vitro* společně s BPS.



Graf č. 1: Graf relativní intenzity fluorescence u oocytů kultivovaných *in vitro* 24 a 48 hodin v různých koncentracích BPS. Odlišnými superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

Po 24hodinové kultivaci oocytů *in vitro* v přítomnosti BPS docházelo k nárůstu relativní intenzity fluorescence v závislosti na rostoucí dávce BPS. Statisticky významné rozdíly byly u všech koncentrací BPS. U koncentrace 30 μM BPS byl nárůst relativní intenzity fluorescence více jak trojnásobný ve srovnání s kontrolní skupinou, a dvojnásobný ve srovnání s koncentrací 300 nM BPS.

Po 48 hod kultivaci *in vitro* došlo ke statisticky významné změně relativní intenzity fluorescence ER β jen u oocytů kultivovaných s 300 nM BPS, kdy došlo k poklesu intenzity fluorescence. U nejnižší a nejvyšší použité koncentrace BPS nedošlo ke změně intenzity fluorescence. Změny relativní intenzity fluorescence tedy nebyly závislé na dávce, ale vytvářely křivku tvaru U. Rozdíly v relativní intenzitě fluorescence ER β mezi jednotlivými skupinami BPS byly méně výrazné, ve srovnání s 24 hodinami kultivace *in vitro*. Nejnižší intenzita fluorescence byla změřena u koncentrace 300 nM BPS. U nejvyšší a nejnižší hodnoty, i kontroly byla intenzita fluorescence téměř shodná.

6 Diskuze

Meiotické zrání je jednou z hlavních a nejdůležitějších událostí gametogeneze, která probíhá v samičím organismu. Je důležitá pro rozmnožování, protože jen plně vyvinutý oocyt může být oplozen a pokračovat ve svém vývoji v embryu. Meióza i vývoj samičího pohlavního systému jsou závislé na koordinovaných biologických procesech a řídí je celá řada faktorů. Narušení těchto procesů má často negativní dopady na reprodukční funkce samic. Do životního prostředí, potravin, předmětů denní potřeby se dostává přičiněním člověka celá řada látek, které zasahují do fyziologických procesů, velmi často právě v oblasti reprodukce (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Patří mezi ně např. těžké kovy. Negativní účinek na reprodukci žen má kadmium (Akesson, 2009), olovo (Nasiadek et al., 2011) a rtuť (Rowland et al., 1994), která mimo jiné negativně působí i na meiotické zrání oocytů, jak bylo prokázáno v *in vitro* experimentech u myší (Shen et al., 2000). U řady látek byly jejich negativní dopady na zdraví a samotnou reprodukci zvířat i lidí odhaleny až po mnoha letech jejich užívání. Patří sem např. nechvalně známé DDT (WHO, 1989) jako masově využívaný insekticid, thalidomid jako „bezpečný“ lék na uklidnění pro těhotné ženy, který jak se později ukázalo má teratogenní a karcinogenní účinky (McBride, 1961).

Mezi exogenní faktory negativně ovlivňující reprodukční funkce na úrovni gamet patří například přírodní látky - fytoestrogeny, které mají nežádoucí účinky na meiotické zrání savčích (prasečích) oocytů (Vodková et al., 2008) na reprodukci samic myší (Chen et al., 2007; Jefferson et al., 2006) i potkanů (Zin et al., 2013). Patří sem ale i pyretroidy, jež nahradily starší prostředky na hubení hmyzu a u kterých byly o řadu let později prokázány jejich negativní účinky na zrání oocytů prasete (Petr, 2013).

Velkou skupinou látek, u kterých byly zaznamenány negativní dopady na reprodukci, jsou i endokrinní disruptory (EDs), které napodobují činnost estrogenů a mají tedy schopnost narušovat rovnováhu fyziologických funkcí organismu na úrovni hormonálního řízení a jejich pleiotropní spektrum účinků je velmi těžké předvídat. Prokázán byl vliv mnoha EDs na průběh vývoje samčích (Li et al., 2011) i samičích (Rubin, 2011; Geens et al., 2012) pohlavních buněk, časný embryonální vývoj (Mok-Linn et al., 2010), ale i reprodukci dospělých jedinců po několika generacích (Susiarjo et al., 2015).

V této diplomové práci byly sledovány účinky BPS, jenž se začal používat jako náhrada za BPA, poté co u něj byly prokázány endokrinně disruptivní účinky (Rochestercorr et Bolden, 2015). O BPS zatím není známo mnoho informací. Bylo provedeno jen pár studií (Liao et al., 2013; Liao et al., 2012; Viñas et Watson, 2013) na nižších obratlovcích, jako jsou např. dánia pruhovaná (Ji et al., 2013), informace o vlivu na savce zatím chybí.

Mechanismus účinku EDs je zprostředkovaný přes estrogenové receptory (ERs), které jsou dvojího typu – ER α a ER β a liší se zastoupením i lokalizací v organismu. Zastoupení ER β je v organismu obecně širší než ER α . Oba typy ER jsou lokalizovány v oocytech, proto jsou ER β významnou cílovou strukturou (Benassayag, 2002, Gruber, 2002). Názory na lokalizaci jednotlivých estrogenových receptorů v průběhu meiotického zrání se liší v různých studiích. ER α byly prokázány v jádrech oocytů nezávisle na folikulárním růstovém stádiu u myši (Xu et al., 2009; Lenie et Smitz, 2008), oproti tomu Saunders et al. (2000) uvádí, že ER α se u lidí a kosmanů nenachází ve folikulech s jednou nebo dvěma vrstvami granulózních buněk. ER β byly lokalizovány v oocytu, granulózních buňkách a *theca* buňkách bez ohledu na stádium folikulogeneze nebo kultivační podmínky (Lenie et Smitz, 2008, Saunders et al., 2000). Sar et Welsch (1999) uvádí, že ER β jsou u dospělých krys exprimovány výlučně v granulózních buňkách ve všech fázích folikulogeneze, ale v jiných buňkách oocytu ani folikulu se nevyskytují. My jsme prokázali expresi ER β v prasečích oocytech během celého meiotického zrání, podobně jako Dode et Graves (2003). Navíc jsme ale vizualizovali jejich lokalizaci v průběhu důležitých momentů meiotického zrání oocytů – v metafázi I a II.

EDs působí skrze ER buď genomickou cestou, zasahující do regulace transkripce (Traphoff et al., 2013), či nengenomickou cestou ovlivňující buněčnou signalizaci (Benassayag et al., 2002). Mohou ale také způsobit změny ohrožující další generace organismů prostřednictvím epigenetických změn, odpovědné za metylaci a acetylaci DNA (Bromer et al., 2010). U ER β byla popsána významná role v regulaci DNA metylace ve specifických genových lokusech (Liu et al., 2016). Nengenomické ovlivnění spermií, které byly exponovány BPA, prokázal Rahman et al. (2015) a nengenomický účinek BPA byl prokázán i na buňkách hypofýzy potkanů (Dang et al., 2009). Genomický účinek BPA potom potvrdil Jorgensen et al. (2000). U BPA byla prokázána silná estrogení aktivita (vom Saal et al., 2007) a podobně tomu může být i v případě BPS.

Navíc, námi pozorovaný účinek BPS k ER β může vycházet i z afinity bisfenolů k ER β . EDs se obecně mohou lišit afinitou k jednotlivým estrogenovým receptorům. Studie Molina-Molina et al. (2013) uvádí, že BPS i BPA mají vyšší afinitu k ER β než k ER α . Stejně tak například i skupina fytoestrogenů se více váže k ER β než ER α (Baber, 2010).

Až do studie provedené v rámci této diplomové práce, nebyl prokázán negativní vliv BPS na vývoj savčích (prasečích) oocytů, zatímco u BPA bylo provedeno mnoho experimentů dokazující narušení vývoje oocyty. Naše studie prokázala vliv BPS na distribuci a expresi ER β v oocytech prasete, v průběhu celého meiotického zrání.

Expres ER β v oocytech ovlivněných BPS v průběhu meiotického zrání se lišila. Po 24 hodinové kultivaci oocytů jsme pozorovali zvýšení množství proteinu ER β v závislosti na dávce, podobně jako pozoroval Chalooob et al. (2013) snižující se počet a motilitu spermií u krys v závislosti na dávce nimodipinu. Největší koncentrace ER byla zaznamenána v prasečím oocyty po 24 hodinách kultivace *in vitro*. Dochází k sedminásobnému nárůstu koncentrace ER, jak uvádí Dode et Graves (2003). Po 48 hodinové kultivaci *in vitro* byla pozorována vlastnost typická pro EDs, a to efekt nízké dávky. Jedná se o schopnost EDs, dosahovat v nízkých dávkách paradoxně vyšších účinků než v dávkách vysokých (vom Saal et Welshons, 2006). Je tak docíleno díky možnosti potlačení nebo úplného vymizení účinků EDs, či hormonů v organismu, a to v případě, že je koncentrace EDs vyšší než fyziologické množství (Vandenberg et al., 2012).

Tento efekt byl demonstrován v řadě studií, mj. u BPA. Např. Jenkins et al. (2011), kteří potvrdili, že nízké dávky BPA (2,5, 25, 250 a 2500 μg BPA / l) mají u myší větší vliv na tumory a jejich velikost, oproti dávkám vyšším. Nejnižší zmiňovaná koncentrace BPA způsobovala vznik největšího počtu tumorů, kdežto u vyšších koncentrací bylo nádorů u myší méně. Koncentrace 25 μg BPA/l vedla ke vzniku největších tumorů myší, při vyšších koncentracích nedocházelo k takovému růstu tumorů. Angle et al. (2013) pozorovali narozená mláďata myší, jejichž matky byly mezi 9 a 18 dnem březosti vystaveny dávkám BPA (od 5 do 50 000 000 μg / kg / den). Mláďata matek vystavených 500 μg měla výrazně zvýšený postnatální přírůstek, zvýšený počet adipocytů a celkového množství břišního tuku, u ostatních skupin nedocházelo k těmto projevům v takové míře. Ke stejnému závěru došel i vom Saal et al. (1997), který efekt nízké dávky prokázal u DES (diethylstilbestrol) na váze prostaty myší. Dávky DES byly podávány v širokém rozmezí 0,002 až 200 ng / g tělesné

váhy. K největšímu nárůstu váhy prostaty došlo u koncentrace 0,2 ng, u ostatních koncentrací byla váha prostaty nižší. V rámci diplomové práce jsme došli k obdobným výsledkům během 48 hodinové kultivace oocytů *in vitro*, kdy dávka 300 nM BPS měla za následek snížení exprese ER β , kdežto u ostatních dávek byla exprese ER β vyšší.

Možným vysvětlením pro mechanismy zodpovědné za nelineární efekty je souvislost interakce mezi ligandem, ať už se jedná o hormony či EDs, s hormonálním receptorem (Vandenberg, 2014). Roli zde hraje také vliv koncentrace ligandu na počet receptorů (Ismail et Nawaz, 2005). V případě, že počet vznikajících receptorů neodpovídá počtu degradovaných, je možné očekávat sníženou odpověď i ve chvíli, kdy koncentrace hormonů či EDs stoupá (von Zastrow et Kobilka, 1994) či dochází k receptorové kompetici (Kohn and Melnick, 2002). To může vysvětlovat efekt nízké dávky, který jsme pozorovali po 48 hodinové kultivaci oocytů *in vitro* s BPS.

Vzhledem k faktu, že estrogeny a tedy i ERs zasahují do regulace meiotického zrání (Spiegel et al., 1978), dá se usuzovat, že BPS ovlivňuje i samotné meiotické zrání oocyty. Nepříznivý vliv na průběh meiotického zrání oocytů byl už dříve popsán u BPA na myších (Eichenlaub-Ritter et al., 2008), i na lidech (Machtinger et al., 2011). Mechanismus působení EDs je obdobný jako působení E2, oba působí přes ERs. Byla provedena studie na myších oocytech, ve které bylo prokázáno, že koncentrace 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ E2 nemá žádný vliv na GVBD ani na vyloučení pólového tělíska. Koncentrace 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ E2 sice neovlivnila celkový počet zralých oocytů, ale vylpoučení pólových tělísek u těchto oocytů byla snížena o 20 % (Eppig et Koide, 1978). U prasečích oocytů E2 během kultivace *in vitro* ovlivňuje meiotické zrání nejen snížením počtu oocytů, které dosáhnou po 48 hodinové kultivaci stadia MII, ale inhibuje také expanzi kumulárních buněk, důležitý proces doprovázející meiotické zrání (Li et al., 2004).

Kumulární buňky mají velmi důležitou funkci během zrání oocyty. Před ovulací podporují kumulární buňky zrání oocyty a krátce po ovulaci se podílí na mechanismu umožňujícím průnik spermie do oocyty (Tesařík et al., 1990). Na kumulárních buňkách se také nachází ERs a prostřednictvím gap junctions ovlivňují samotný oocyt a jeho zrání. Vzhledem k tomu, že granulózní i kumulární buňky, ve kterých jsou tyto receptory exprimované, jsou důležité pro metabolické procesy v oocyty i pro jeho růst, EDs mohou negativně ovlivnit vývoj oocyty a tím i samotnou reprodukci (Can et al., 2005). Je tedy zřejmé, že ERs na kumulárních buňkách ovlivňují konečné působení BPS na oocyty.

Na základě výsledků této práce a z výše uvedených účinků BPA, lze tedy usuzovat, že BPS může mít na reprodukční soustavu, resp. průběh meiotického zrání oocytů, podobně neblahé účinky jako BPA.

7 Závěr

Meiotické zrání je složitý proces, jehož výsledkem je plně zralý oocyt, který je schopný dokončit meiotické zrání a být oplozen. Tento proces je řízen mnoha signálními kaskádami. Pokud dojde k narušení těchto kaskád, často je narušena celá meióza i následný embryonální vývoj. Jedním z faktorů, které narušují meiózu, jsou i bisfenoly, patřící do velké skupiny endokrinních disruptorů.

Výsledky této diplomové práce prokázaly negativní vliv velmi nízkých koncentrací BPS na distribuci estrogenových receptorů beta v průběhu meiotického zrání, po 24 a 48 hodinách kultivace *in vitro*. Na základě vyhodnocení relativní intenzity fluorescence byla prokázána i změněná exprese těchto receptorů. Po 48 hodinové kultivaci byla intenzita fluorescence nejvyšší u koncentrace 30 μM BPS.

BPS začal být diskutován až v poslední době, kdy nahradil v některých plastech BPA. Na BPS je zatím provedeno jen velmi málo studií, většina jich ale prokazuje negativní vliv na zdraví člověka i zvířat. Kvůli jeho stukturální podobnosti s BPA jsou mu přisuzovány i podobné vlastnosti. Je však potřeba provést více experimentů, aby byly prozkoumány všechny negativní důsledky tohoto analogu BPA. Vzhledem k námi zjištěným výsledkům se můžeme obávat, zda BPS není pouze politováníhodnou náhradou za BPA.

8 Seznam použité literatury

- Abaci, A., Demir, K., Bober, E., Buyukgebiz, A. 2009. Endocrine disrupters - with special emphasis on sexual development. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 6 (4). 464-75.
- Ajduk, A., Małagocki, A., Maleszewski, M. 2008. Cytoplasmic maturation of mammalian oocytes: development of a mechanism responsible for sperm-induced Ca^{2+} oscillations. *Reproductive Biology*. 8 (1). 3-22.
- Akesson, A., Julin, B., Wolk, A. 2008. Long- term dietary cadmium intake and postmenopausal endometrial cancer incidence: a population- based prospective cohort study. *Cancer Research*. 68 (15). 6435–6441.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing. Ústí nad Labem. 630 s. ISBN: 8090290620.
- Aluru, N., Leatherland, J. F., Vijayan, M. M. 2010. Bisphenol A in oocytes leads to growth suppression and altered stress performance in juvenile rainbow trout. *PLoS One*. 5. e10741.
- Angle, B. M., Do, R. P., Ponzi, D., Stahlhut, R. W., Drury, B. E., Nagel, S. C., Welshons, W. V. 2013. Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): Evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. *Reproductive and Toxicology*. 42. 1-12.
- Azziz, R., Carmina, E., Dewailly, D., Diamanti-Kandarakis, E., Escobar-Morreale, H. F., Futterweit, W., Janssen, O. E., Legro, R. S., Norman, R. J., Taylor, A. E., Witchel, S. F. 2006. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 91 (11). 4237-45.
- Baber, R. 2010. Phytoestrogens and post reproductive health. *Maturitas*. 66. 344-349.
- Bar-El, D. S., Reifen, R. 2010. Soy as an endocrine disruptor: cause for caution? *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 23 (9). 855-61.
- Beg, M. A., Ginther, O. J. 2006. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction*. 132 (3). 365-77.

- Benassayag, C., Perrot-Applanat, M., Ferre F. 2002. Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. *Journal of Chromatography*. 777. 233-248.
- Berger, R. G., Foster, W. G., DeCatanzaro, D. 2010. Bisphenol-A exposure during the period of blastocyst implantation alters uterine morphology and perturbs measures of estrogen and progesterone receptor expression in mice. *Reproductive Toxicology*. 30. 393-400.
- Black, J. L., Erickson, B. H. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *Anatomical Record*. 161. 45-56.
- Bolli, A., Bulzomi, P., Galluzzo, P., Acconcia, F., Marino, M. 2010. Bisphenol A impairs estradiol-induced protective effects against DLD-1 colon cancer cell growth. *IUBMB Life*. 62 (9). 684-687.
- Bushnik, T., Haines, D., Levallois, P., Levesque, J., Van Oostdam, J. 2010. Lead and bisphenol A concentrations in the Canadian population. *Health Reports*, 21 (3). 7-18.
- Calafat, A. M., Needham, L. L. 2007. Human exposures and body burdens of endocrine-disrupting chemicals. *Humana Press*. 23. 253-268.
- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., 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*. 16 (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.
- Caserta, D., Di Segni, N., Mallozzi, M., Giovanale, V., Mantovani, A., Marci, R., Moscarini, M. 2014. Bisphenol a and the female reproductive tract: an overview of recent laboratory evidence and epidemiological studies. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 12 (1). 37.
- Chaloob, R., Numan, I. T., Hussain, S. A. 2013. Dose-dependent reproductive toxicity of nimodipine in male rats. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*. 3 (1). 17-22.
- Chao, H., Zhang, X., Chen, B., Pan, B., Zhang, L., Li, L., Sun, X., Shi, Q., Shen, W. 2012. Bisphenol A exposure modifies methylation of imprinted genes in mouse oocytes via the

estrogen receptor signaling pathway. *Histochemistry and Cell Biology*. 137 (2). 249-259.

Chen, M. Y., Ike, M., Fujita, M. 2002. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environmental Toxicology*. 17. 80–86.

Chen, Y., Jefferson, W. N., Newbold, R. R., Padilla-Banks, E., Pepling, M. E. 2007. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 148. 3580–3590.

Chou, W., Chen, J., Lin, C., Chen, Y., Shih, F., Chuang, C. 2011. Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. *Environmental Health*. 10. 94.

Conti, M., Andersen, C. B., Richard, F., Mehats, C., Chun, S. Y., Horner, K., Jin, C., Tsafiriri, A. 2002. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular Cell Endocrinology*. 187. 153–159.

Coticchio, G., Albertini, D. F., De Santis, L. 2013. *Oogenesis*. Springer. London. p. 364. ISBN: 9780857298256.

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

Crews, D., Putz, O., Thomas, P., Hayes, T., Howdeshell, K. 2003. Animal models for the study of the effects of mixtures, low doses, and the embryonic environment on the action of endocrine disrupting chemicals. *Pure and Applied Chemistry. SCOPE/IUPAC Project Implications of Endocrine Active Substances for Humans and Wildlife*. 75. 2305–2320.

Crinnion, W. J. 2009. Maternal levels of xenobiotics that affect fetal development and childhood health. *Alternative Medicine Review*. 14 (3). 212-22.

Dang, V. H., Nguyen, T. H., Lee, G. S., Choi, K. C. Jeung, E. B. 2009. In vitro exposure to xenoestrogens induces growth hormone transcription and release via estrogen receptor-dependent pathways in rat pituitary GH3 cells. *Steroids*. 74 (8). 707-714.

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., Gore, A. C. 2009. *Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society*

Scientific Statement. *Endocrine reviews*. 30 (4). 293-342.

Dickerson, S. M., Gore, A. C. Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 8 (2). 143-59.

Dode, M. A. N., Graves, C. N. 2003. Role of estradiol-17 β on nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Animal Reproduction Science*. 78. 99–110.

Dumesic, D. A., Abbott, D. H., Padmanabhan, V. 2007. Polycystic ovary syndrome and its developmental origins. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 8 (2). 127-41.

Edson, M. A., Nagaraja, A. K., Matzuk, M. M. 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*. 30 (6). 624-712.

EFSA (European Food and Safety Agency). 2012. EFSA Scientific Colloquium Summary Report. 17. 64.

Ehrlich, S., Williams, P. L., Missmer, S. A., Flaws, J. A., Berry, K. F., Calafat, A. M. 2012. Urinary Bisphenol A concentrations and implantation failure among women undergoing in vitro fertilization. *Environmental Health Perspectives*. 120 (7). 978-83.

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/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 651 (1-2). 82-92.

Eppig, J. J. 1991. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *BioEssays*. 13. 569-574.

Eppig, J. J. 1994. Oocyte-somatic cell communication in the ovarian follicles of mammals. *Seminars in Developmental Biology*. 5 (1). 51-59.

Eppig, J. J., Koide, S. L. 1978. Effects of progesterone and oestradiol-17 β on the spontaneous meiotic maturation of mouse oocytes. *Journal of reproduction and fertility*. 53. 99-101.

Fernández, M., Bianchi, M., Lux-Lantos, V., Libertun, C. 2009. Neonatal exposure to

- bisphenol a alters reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats. *Environmental Health Perspectives*. 117 (5). 757-62.
- Fernández, M., Bourguignon, N., Lux-Lantos, V., Libertun, C. 2010. Neonatal exposure to bisphenol a and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats. *Environmental Health Perspectives*. 118 (9). 1217-22.
- Foxcroft, G. R., Hunter, M. G. 1985. Basic physiology of follicular maturation in the pig. *Journal of reproduction and fertility*. 33. 1-19.
- Geens, T., Aerts, D., Berthot, C. 2012. A review of dietary and nondietary exposure to bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology*. 50 (10). 3725-3740.
- Gosden, R. G., Telfer, E. E. 1987. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *Journal of Zoology*. London. 211 (1). 169-175.
- Grignard, E., Lapenna, S., Bremer, S. 2012. Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S. *Toxicology In Vitro*. 26. 727–731.
- Gruber, C. J., Tschuggel, W., Schneeberger, C., Huber, J. C. 2002. Production and Actions of Estrogens. *The New England Journal of Medicine*. 346. 340-350.
- Harrison, G. S., Wierman, M. E., Nett, T. M., Glode, L. M. 2004. Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells. *Endocrine-Related Cancer*. 11 (4). 725-48.
- Herlands, R. L., Schultz, R. M. 1984. Regulation of mouse oocyte growth: probable nutritional role for intercellular communication between follicle cells and oocytes in oocyte growth. *Journal of Experimental Zoology*. 229. 317–325.
- Hunt, P. A., Koehler¹, 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 (7). 546-553.
- Hunt, P. A., Lawson, C., Gieske, M., Murdoch, B., Smith, H., Marre, A., Hassold, T., VandeVoort, C. 2012. Bisphenol A alters early oogenesis and follicle formation in the fetal ovary of the rhesus monkey. *PNAS*. 109 (43). 215-219.

- Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5. 122–130.
- Ismail, A., Nawaz, Z. 2005. Nuclear hormone receptor degradation and gene transcription: an update. *IUBMB Life*. 57 (7). 483-90.
- Jefferson, W., Newbold, R., Padilla-Banks, E., Pepling, M. 2006. Neonatal genistein treatment alters ovarian differentiation in the mouse: inhibition of oocyte nest breakdown and increased oocyte survival. *Biology of Reproduction*. 74. 161–168.
- Jenkins, S., Wang, J., Eltoum, I., Desmond, R., Lamartiniere, C. A. 2011. Chronic Oral Exposure to Bisphenol A Results in a Nonmonotonic Dose Response in Mammary Carcinogenesis and Metastasis in MMTV-erbB2 Mice. *Environmental Health Perspectives*. 119 (11). 1604 – 1609.
- Ji, K., Hong, S., Kho, Y., Choi, K. 2013. Effects of Bisphenol S Exposure on Endocrine Functions and Reproduction of Zebrafish. *Environmental science and technology*. 47. 8793-8800.
- 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., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D. T., Tilly, J. L. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*. 122. 303–315.
- Jooné, C. J., Schulman, M. L., Bertschinger, H. J. 2016. Ovarian dysfunction associated with zona pellucida-based immunocontraceptive vaccines. *Theriogenology*. 4. 1-9.
- Jørgensen, M., Vendelbo, B., Skakkebaek, N. E., Leffers, H. 2000. Assaying estrogenicity by quantitating the expression levels of endogenous estrogen-regulated genes. *Environmental Health Perspectives*. 108 (5). 403-412.
- Kandaraki, E., Chatzigeorgiou, A., Livadas, S., Palioura, E., Economou, F., Koutsilieris, M. 2011. Endocrine disruptors and polycystic ovary syndrome (PCOS): elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 96. 480–484.
- Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S. 1996.

- Research Leads for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U. S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives*, 104 (4). 715–740.
- Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Watanabe, H., Ohta, S. 2005. *Toxicological Sciences*. 84 (2). 249-259.
- Kishimoto, T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology*. 15 (6). 654-663.
- Kohn, M. C., Melnick, R. L. 2002. Biochemical origins of the non-monotonic receptor-mediated dose–response. *Journal of Molecular Endocrinology*. 29. 113–123
- Krishnan, A. V., Stathis, P., Permeth, S. F., Tokes, L., Feldman, D. 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*. 132(6). 2279-86.
- Kubelka, M., Motlik, J., Fulka, J. J., Prochazka, R., Rimkevichova, Z., Fulka, J. 1988. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. *Gamete Research*. 19. 423-431.
- Lange, I. G. H., Meyer, H. H. D. 2003. Evolution of oestrogen functions in vertebrates. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 83 (1-5). 219-226.
- Lee, S., Liu, X., Takeda, S., Choi, K. 2013. Genotoxic potentials and related mechanisms of bisphenol A and other bisphenol compounds: a comparison study employing chicken DT40 cells. *Chemosphere*. 93. 434–440.
- Lenie, S., Cortvrintd, R., Eichenlaub-Ritter, U., Smitz, J. 2008. Continuous exposure to bisphenol A during in vivo follicular development induces meiotic abnormalities. *Mutation Research*. 651. 71-81.
- Lenie, S., Smitz, J. 2008. Estrogen receptor subtypes localization shifts in cultured mouse ovarian follicles. *Histochemistry and Cell Biology*. 129. 827-840.
- Li, D. K., Zhou, Z., Miao, M., He, Y., Wang, J., Ferber, J., Herrinton, L. J., Gao, E., Yuan, W. 2011. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertility and Sterility*. 95. 625–630.

- Li, Q., Niwa, K., Hunter, M. G. 2004. Effects of 17beta-estradiol on in vitro maturation of pig oocytes in protein-free medium. *Journal of Reproduction and Development*. 50 (3). 305-313.
- Liang, C. G., Su, Y. Q., Fan, H. Y., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2007. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of Mitogen-activated Protein Kinase. *Molecular Endocrinology*. 21 (9). 2037-2055.
- Liao, C., Kannan, K. 2013. Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61. 4655-4662.
- Liao, C., Liu, F., Guo, Y., Moon, H. B., Nakata, H., Wu, Q. 2012. Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the United States and several Asian countries: implications for human exposure. *Environmental Science and Technology*. 46. 9138–9145.
- Liu, M. 2011. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 9 (1). 149-156.
- Liu, Y., Duong, W., Krawczyk, C., Bretschneider, N., Borbély, G., Varshney, M., Zinser, C., Schär, P., Rüegg, J. 2016. Oestrogen receptor β regulates epigenetic patterns at specific genomic loci through interaction with thymine DNA glycosylase. *Epigenetics & Chromatin*. 9. 1-19.
- Ma, Y., Han, J., Guo, Y., Lam, P. K. S., Wu, R. S. S., Giesy, J. P., Zhang, X., Zhou, B. 2002. Disruption of endocrine function in in vitro H295R cell-based and in in vivo assay in zebrafish by 2,4-dichlorophenol. *Aquatic Toxicology*. 106–107. 173–181.
- Machtiger, R., Hauser, R., Combelles, C., Racowsky, C. 2011. The impact of bisphenol A (BPA) on human oocyte meiotic maturation. *Fertility and sterility*. 96 (3). S7.
- Machtiger, R., Orvieto, R. 2014. Bisphenol A, oocyte maturation, implantation, and IVF outcome: review of animal and human data. *Reproductive BioMedicine Online*. 29 (4). 404-10.
- Manfo, F. P., Jubendradass, R., Nantia, E. A., Moundipa, P. F., Mathur, P. P. 2014. Adverse effects of bisphenol A on male reproductive function. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 228. 57-82.

- Mendonca, K., Hauser, R., Calafat, A. M., Arbuckle, E., Duty, S. M. 2014. Bisphenol A concentrations in maternal breast milk and infant urine. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 87 (1). 13-20.
- McBride, W. G. 1961. Thalidomide and congenital abnormalities. *The Lancet*. 278. 1358.
- McGeady, T. A., Quinn, P. J., FitzPatrick, E. S., Ryan, M. T. 2006. *Veterinary Embryology*. Blackwell Publishing. Ames. p. 377. ISBN: 9781405111478.
- McGee, E. A., Hsueh, A. J. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*. 21. 200–214.
- McLachlan, J. A. 1993. Functional toxicology: a new approach to detect biologically active xenobiotics, *Environmental Health Perspect*. 101. 386.
- McLachlan, J. A., Simpson, E., Martin, M. 2006. Endocrine disrupters and female reproductive health. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 20 (1). 63-75.
- Mehlmann, L. M., Jones, T. L., Jaffe, L. A. 2002. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science*. 297. 1343–1345.
- Mendoza-Rodríguez, C. A., García-Guzmán, M., Baranda-Avilaa, N., Morimoto, S., Perrot-Appianat, M., Cerbóna, M. 2011. Administration of bisphenol A to dams during perinatal period modifies molecular and morphological reproductive parameters of the offspring. *Reproductive Toxicology*. 31 (2). 177–183.
- 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.
- Mok-Lin, E., Ehrlich, S., Williams, P. L., Petrozza, J., Wright, D. L., Calafat, A. M., Ye, X., Hauser, R. 2010. Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF. *International Journal of Andrology*. 33. 385–393.
- Molina-Molina, J. M., Amaya, E., Grimaldi, M., Saenz, J. M., Real, M., Fernandez, M. F., Balaguer, P., Olea, N. 2013. In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of

bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 272. 127–136.

Moor, R. M., Warnes, G. M. 1978. Regulation of oocyte maturation in mammals. In: Crighton, D. B., Foxcroft, G. R., Haynes, N. B. (eds). *Control of Ovulation*. Butterworths. London. p. 159–176. ISBN: 9780408709248.

Morice, L., Benaitreau, D., Dieudonne, M. N., Morvan, C., Serazin, V., de Mazancourt, P. 2011. Antiproliferative and proapoptotic effects of bisphenol A on human trophoblastic JEG-3 cells. *Reproductive Toxicology*. 32. 69-76.

Motlík, J., Crozet, N., Fulka, J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*. 72 (2). 323-328.

Motlík, J., Fulka, J. 1976. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *The Journal of Experimental Zoology*. 198 (2). 155-162.

Naderi, M., Wong, M. Y., Gholami, F. 2014. Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquatic toxicology*. 148. 195-203.

Nagai, T., Ebihara, M., Onishi, A., Kubo, M. 1997. Germinal Vesicle Stages in Pig Follicular Oocytes Collected by Different Methods. *Journal of Reproduction and Development*. 43 (4). 339-343.

Nasiadek, M., Swiatkowska, E., Nowinska, A., Krawczyk, T., Wilczynski, J., Sapota, A. 2011. The effect of cadmium on steroid hormones and their receptors in women with uterine myomas. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 60 (4). 734–741.

Newbold, R. R., Jefferson, W. N., Padilla-Banks, E. 2007. Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract. *Reproductive Toxicology*. 24 (2). 253-8.

Newbold, R. R., Jefferson, W. N., Padilla-Banks, E. 2009. Prenatal exposure to bisphenol A at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. *Environmental Health Perspectives*. 117. 879-885.

- Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W. 2001. *Artur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8th ed. Elsevier Limited. London. p. 868. ISBN: 978-0-7020-2556-3.
- 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.
- Owens, J. W., Ashby, J. 2002. Critical review and evaluation of the uterotrophic bioassay for the identification of possible estrogen agonists and antagonists: in support of the validation of the OECD uterotrophic protocols for the laboratory rodent. *Critical Reviews in Toxicology*. 32. 445–520.
- Petr, J., Chmelikova, E., Zalmanova, T., Tumova, L., Kheilova, K., Kucerova-Chrpova, V., Jilek, F. 2013. Pyrethroids cypermethrin, deltamethrin and fenvalerate have different effects on in vitro maturation of pig oocytes at different stages of growth. *Animal*. 7. 134–142.
- Plant, T. M., Zeleznik, A. J. 2015. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 4th ed. Academic Press. New York. p. 2684. ISBN: 9780123971753.
- Qiao, L., Zheng, L., Cai, D. 2010. Study on the levels of the bisphenol A, octylphenol, 4-nonylphenol in serum of precocious girls. *Wei Sheng Yan Jiu*. 39 (1). 9–12.
- Rahman, M. S., Kwon, W. S., Lee, J. S., Yoon, S. J., Ryu, B. Y., Pang, M. G. 2015. Bisphenol-A affects male fertility via fertility-related proteins in spermatozoa. *Scientific Reports*. 5. 9169.
- Reece, J. B., Lisa, A. U., Cain, M. L., Wassarman, S. A., Minorsky, P. V., Jackson, R. B. 2009. *Campbell Biology*. 9th ed. Pearson. San Francisco. p. 1472. ISBN: 978-0-321-55823-7.
- Richards, J. S., Russel, D. L., Ochsner, S., Hsies, M., Doyle, K. H., Allison, E, Lo Y. K., Sharma, K. 2002. Novel Signaling Pathways That Control Ovarian Follicular Development, Ovulation, and Luteinization. *The Endocrine Society*. 17 (3). 12-17.
- Rivera, O. E., Varayoud, J., Rodriguez, H. A., Munoz-de-Toro, M., Luque, E. H. 2011. Neonatal exposure to bisphenol A or diethylstilbestrol alters the ovarian follicular dynamics in the lamb. *Reproductive Toxicology*. 32. 304–312.

- Rochestercorr, 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.
- Rosenmai, A. K., Dybdahl, M., Pedersen, M., Vugt-Lussenburg, B. M. A., Wedebye, E. B., Taxvig, C., Vinggaard, A. M. 2014. Are structural analogues to bisphenol A safe alternatives?. *Toxicological Sciences*. 15. 1-40.
- Roux, P. P., Blenis, J. 2004. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and molecular biology reviews*. 68 (2). 320-344.
- Rowland, A. S., Baird, D. D., Weinberg, C. R., Shore, D. L., Shy, C. M., Wilcox, A. J. 1994. The effect of occupational exposure to mercury vapor on the fertility of female dental assistants. *Occupational and Environmental Medicine*. 51 (1). 28–34.
- Rubin, B. S. 2011. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 127. 27–34.
- Sadler, T. W. 2011. *Langmanova lékařská embryologie*. Grada. Praha. 432 s. ISBN: 978-80-247-2640-3.
- Sanderson, J. T. 2006. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences*. 94. 3–21.
- Sar, M., Welsch, F. 1999. Differential Expression of Estrogen Receptor- β and Estrogen Receptor- α in the Rat Ovary. *Endocrinology*. 140 (2). 963-971.
- Saunders, P. T, Millar, M. R., Williams, K., Macpherson, S., Harkiss, D., Anderson, R. A., Orr, B., Groome, N. P., Scobie, G., Fraser, H. M. 2000. Differential expression of estrogen receptor- α and - β and androgen receptor in the ovaries of marmosets and humans. *Biology of Reproduction*. 63. 1098–1105.
- Schally, A. V., Arimura, A., Kastin, A. J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T. W., Nair, R. M., Debeljuk, L., White, W. F. 1971. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science*. 173. 1036–1038.

Sela-Abramovich, S., Chorev, E., Galiani, D., Dekel, N. 2005. Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology*. 146. 1236–1244.

Senger, P. L. 2003. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Current Concepts. New York. p. 210. ISBN: 978-0965764827.

Shen, W., Chen, Y., Li, C., Ji, Q., 2000. Effect of mercury chloride on the reproductive function and visceral organ of female mouse. *Wei Sheng Yan Jiu*. 29. 75–77.

Silva, E., Kabil, A., Kortenkamp, A. 2010. Cross-talk between non-genomic and genomic signalling pathways—distinct effect profiles of environmental estrogens. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 245 (2). 160–170.

Sohoni, P., Tyler, C. R., Hurd, K., Caunter, J., Hetheridge, M., Williams, T., Woods, C., Evans, M., Toy, R., Gargas, M., Sumpter, J. P. 2001. Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Science & Technology*. 35. 2917–2925.

Souter, I., Smith, K. W., Dimitriadis, I., Ehrlich, S., Williams, P. L., Calafat, A.M., Hauser, R. 2013. The association of bisphenol-A urinary concentrations with antral follicle counts and other measures of ovarian reserve in women undergoing infertility treatments. *Reproductive Toxicology*. 42. 224-31.

Spiegel, J., Jones, E., Snyder, B. W. 1978. Estradiol-17 β interference with meiotic maturation in *Rana pipiens* ovarian follicles: Evidence for inhibition of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Reproductive Biology*. 204 (2). 187-191.

Stojkovic, M., Motlik, J., Kolle, S., Zakhartchenko, V., Alberio, R., Sinowatz, F., Wolf, E. 1999. Cell-cycle control and oocyte maturation: Review of literature. *Reproduction in Domestic Animals*. 34. 335-342.

Sugiura, Y., Kashiba, M., Maruyama, K., Hoshikawa, K., Sasaki, R., Saito, K., Kimura, H., Goda, N., Suematsu, M. 2005. Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. *Antioxidants and Redox Signaling*. 7. 781–787.

- Sun, Q. Y., Lai, L., Park, K. W., Kuhholzer, B., Prather, R. S., Schatten, H. 2001. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogenactivated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*. 64. 871-889.
- 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. e5.
- Susiarjo, M., Sasson, I., Mesaros, C., Bartolomei, M. S. 2013. Bisphenol A exposure disrupts genomic imprinting in the mouse. *PLoS Genet*. 9 (4). e1003401.
- Swedenborg, E., Power, K. A., Cai, W., Pongratz, I., Rüegg, J. 2009. Regulation of estrogen receptor beta activity and implications in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 66 (24). 3873-94.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., de Kruif, A. 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular reproduction and development*. 61 (3). 414 – 424.
- Tello, J. A., Wu, S., Rivier, J. E., Sherwood, N. M. 2008. Four functional GnRH receptors in zebrafish: analysis of structure, signaling, synteny and phylogeny. *Integrative and Comparative Biology*. 48. 570–587.
- Tena-Sempere, M. 2010. Kisspeptin/GPR54 system as potential target for endocrine disruption of reproductive development and function. *International Journal of Andrology*. 33 (2). 360-8.
- Tesařík, J., Mendoza Oltras, C., Testar, J. 1990. Effect of the human cumulus oophorus on movement characteristics of human capacitated spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility*. 88. 665 – 675.
- Traphoff, T., Heiligentag, M., Hajj, N. E., Haaf, T. 2013. Chronic exposure to a low concentration of bisphenol A during follicle culture affects the epigenetic status of germinal vesicles and metaphase II oocytes. *Fertility and sterility*. 100 (6). 1758-167.
- Ullah, H., Jahan, S., Ain, Q. U., Shaheen, G., Ahsan, N. 2016. Effect of bisphenol S exposure on male reproductive system of rats: A histological and biochemical study. *Chemosphere*. 152. 383-391.

Vandenberg, L. N., Chahoud, I., Heindel, J. J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F. J., Schoenfelder, G. 2010. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*. 118. 1055-70.

Vandenberg, L. N., Maffini, M. V., Wadia, P. R., Sonnenschein, C., Rubin, B. S., Soto, A. M. (2007). Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology* 148. 116–127.

Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, 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.

Viñas, P., Campillo, N., Martínez-Castillo, N., Hernández-Córdoba, M. 2010. Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 397. 115–125.

Viñas, R., Watson, C. S. 2013. Bisphenol S Disrupts Estradiol-Induced Nongenomic Signaling in a Rat Pituitary Cell Line: Effects on Cell Functions. *Environmental Health Perspectives*. 121 (5). 352-3358.

Vodková, Z., Rajmon, R., Petr, J., Klabanová, P., Jílek, F. 2008. Effects of genistein and genistin on in vitro maturation of pig oocytes. *Czech Journal of Animal Science*. 53. 1-8.

vom Saal, F. S., Akingbemi, B. T., Belcher, S. M., Birnbaum, L. S., Crain, D. A., Eriksen, M., Farabolini, F., Guillette, L.J., Hauser, R., Heindel, J. J. 2007. Chapel Hill Bisphenol A Expert Panel Consensus Statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reproductive Toxicology*. 24. 131–138

vom Saal, F. S., Timms, B. G., Montano, M. M., Palanza, P., Thayer, K. A., Nagel, S. C., Dhar, M. D., Ganjam, V. K., Parmigiani, S., Welshons, W. V. 1997. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94 (5). 2056-2061.

vom Saal, F. S., Welshons, W. V. 2006. Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environmental Research*. 100. 50-76.

von Zastrow, M., Kobilka, B. K. 1994. Antagonist-dependent and -independent steps in the mechanism of adrenergic receptor internalization. *The Journal of Biological Chemistry*. 269 (28). 18448–18452.

Vrzáňová, M., Heresová, J. 2003. Phytoestrogeny. *Interní medicína pro praxi*. 5 (9). 448 – 451.

Wassarman, P. M., Albertini, D. F. 1994. The mammalian ovum. In: Knobil, E., Neil, J. D. (eds.). *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. Raven Press. New York. p. 79-122. ISBN: D-781700868.

Xi, W., Lee, C. K. F., Yeung, W. S. B., Giesy, J. P., Wong, M. H., Zhang, X., Hecker, M., Wong, C. K. C. 2011. Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice. *Reproductive Toxicology*. 31. 409–417.

Xu, H., Lin, A., Zhu, J., Li, S., Ouyang, Y., Chen, Y., Sun, Q. 2009. Changes in estrogen receptor- α variant (ER- α 36) expression during mouse ovary development and oocyte meiotic maturation. *Histochemistry and Cell Biology*. 131. 347-354.

Ye, J., Flint, A. P., Luck, M. R., Campbell, K. H. 2003. Independent activation of MAP kinase and MPF during the initiation of meiotic maturation in pig oocytes. *Reproduction*. 125 (5). 645-656.

Zeleznik, A. J. 2004. The physiology of follicle selection. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 16 (2). 31.

Zhang, X., Chang, H., Wiseman, S., He, Y., Higley, E., Jones, P., Wong, C. K. C., Al-Khedhairy, A., Giesy, J. P., Hecker, M. 2011. Bisphenol A disrupts steroidogenesis in human H295R cells. *Toxicological Sciences*. 121. 320–327.

Zin, S. R., Omar, S. Z., Khan, N. L. A., Musameh, N. I., Das, S., Kassim, N. M. 2013. Effects of the phytoestrogen genistein on the development of the reproductive system of Sprague Dawley rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 68 (2). 253-262.