

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Vliv bisfenolu S na utváření meiotického vřetene během
meiotického zrání prasečích oocytů**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Tereza Petráková

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

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

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 12.4.2017

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Tereze Žalmanové, Ph.D. za její rady, trpělivost, vstřícný přístup a odborné vedení mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Kristýně Hoškové Ph.D. za pomoc a vedení při zpracování experimentální části práce v laboratoři a také bych ráda touto cestou poděkovala celému kolektivu laboratoře na KVD. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

Vliv bisfenolu S na utváření meiotického vřetene během meiotického zrání prasečích oocytů

Souhrn

Proces vývoje oocyty je velmi složitý mechanismus, který je ovlivěn mnoha faktory. V posledních letech roste zájem o problematiku tzv. endokrinních disruptorů (ECD), chemických látek vyskytujících se v životním prostředí, které mohou vyvolávat škodlivé účinky prostřednictvím interference s endokrinním systémem zvířat a lidí. ECD neohrožují život, ale po dlouhodobém působení na organismus mohou způsobit zejména poruchy reprodukce. V dnešní době je nejčastěji používán pro zpevnění polymerů bisfenol A, který ovšem pro své vlastnosti musel být zakázán například pro výrobu kojeneckých lahví a dalších produktů. V takovýchto případech byl bisfenol A často nahrazen bisfenolem S (BPS). V posledních letech se objevují studie, které dokazují, že tento bisfenol není neškodný.

Na základě studia působení endokrinních disruptorů a dostupné odborné literatury o BPS byla stanovena hypotéza, podle které BPS narušuje meiotické zrání oocyty. Cílem této diplomové práce bylo prostřednictvím vhodných experimentů ověřit tuto hypotézu na modelu prasečích oocytů. Prasečí oocyty se svými vlastnostmi podobají vajíčkům žen více než například vajíčka potkanů či laboratorních myší. Z tohoto důvodu jsou prasečí oocyty ideální model.

Pomocí imunocytochemického barvení a kolokalizační metody s využitím analýzy obrazu byla získána výsledná data. Výsledky sledování klíčového proteinu meiotického zrání, alfa - tubulinu potvrdily, že bisfenol S způsobuje těžká poškození zrajících vajíček prasete. I při velmi nízkých koncentracích BPS dochází k nepravdělnému uspořádání dělicího vřeténka a k poruchám rozdělení dědičné informace.

Je tedy jasné, že současné poznatky o účincích bisfenolu S nejsou zdaleka vyčerpávající a prezentují jen zlomek schopností, kterými může BPS ohrožovat zdraví zvířat i člověka. Skutečné riziko, které BPS představuje, vyžaduje další studie mechanismu jeho účinku.

Klíčová slova: prase, oocyt, bisfenol S, cytoskelet, tubulin

Effect of bisphenol S on meiotic spindle formation during meiotic maturation of porcine oocytes

Summary

The process of developing oocyte is a very complex mechanism that is influenced by several factors. In recent years interest in the issue of Endocrine disruptors (ECD), chemical substances present in the environment which can cause deleterious effects by interfering with the endocrine system of animals and humans, is growing. ECD are not life threatening, but after prolonged effect on the organism can cause mainly reproductive disorders. Nowadays, ECD are most commonly used to reinforce polymers of bisphenol A, which had to be disabled for its properties for the production of baby bottles and other products. In such cases, bisphenol A was replaced by bisphenol S (BPS). In recent years, there are studies that show that bisphenol S is not harmless.

Hypothesis was determined based on the study of BPS, which states that the BPS disrupts meiotic maturation of oocyte. The aim of this thesis was to validate this hypothesis on the model of porcine oocytes through appropriate experiments. Porcine oocytes closely resemble women's ovum, more than oocyte of rats or laboratory mice. For this reason, porcine oocytes are perfect model.

The resulting data were obtained by immunocytochemical staining and co-localization methods using an image analysis. Our results of changes in formation of key meiotic protein, alpha tubulin confirmed that bisphenol S causes serious damage to maturing porcine ovum. Even at very low concentrations of BPS occurs in an irregular arrangement of the mitotic spindle and malfunctions distribution of inheritable information.

It is clear that current knowledge about the effects of bisphenol S are anything but exhaustive and only present a fraction of capabilities, which BPS can threaten the health of animals and humans. Actual risk that BPS represents, requires further studies of the mechanism of its effects.

Keywords: pig oocyte, bisphenol S, cytoskeleton, tubulin

Obsah

1 Úvod	1
2 Vědecká hypotéza a cíl práce	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Oogeneze.....	3
3.1.1 Fáze množení	3
3.1.2 Folikulogeneze a fáze růstu oocyty	5
3.1.3 Zrání oocyty.....	8
3.2 Regulace meiotického zrání	10
3.2.1 MPF	10
3.2.2 Cyklické nukleotidy	11
3.2.3 Vápenaté ionty	11
3.2.4 MAPK.....	12
3.3 Endokrinní systém.....	13
3.3.1 Endokrinní disruptory	13
3.3.2 Bisfenol A	14
3.3.2.1 Účinky bisfenolu A na savčí organismus	16
3.3.3 Bisfenol S.....	19
3.3.3.1 Účinky bisfenolu S na savčí organismus.....	20
4 Materiály a metodika	21
4.1 Získávání kumulo-oocytárních komplexů.....	21
4.2 Kultivace oocytů v podmínkách in vitro	21
4.3 Imunocytochemie	22
4.4 Analýza obrazu.....	24
4.5 Statistická analýza.....	24
5 Výsledky	25
5.1 Ověření účinků BPS na tvorbu meiotického vřetena v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů.....	25
6 Diskuse	28
7 Závěr	31
8 Seznam použité literatury	32

1 Úvod

V současné době dochází k prudkému rozvoji reprodukčních biotechnologií, jakožto vědního oboru, který nachází široké uplatnění nejen v humánní medicíně, ale i v chovech hospodářských zvířat. Metody biotechnologií jsou obvykle omezeny počtem zralých oocytů ve vaječníku. Řešení by mohl přinést výzkum v oblasti meiotického zrání oocytu.

Stále častěji se setkáváme s řadou environmentálních faktorů, které ovlivňují celý průběh vývoje oocytu, mezi které se mimo jiné řadí i endokrinní disruptory. Ty mají schopnost narušovat rovnováhu fyziologických funkcí organismu na úrovni hormonálního řízení a ovlivňovat reprodukci hospodářských zvířat i člověka. Přísné regulaci a podrobnému studiu podléhá v současné době bisfenol A, jehož produkce byla na základě prokázaných účinků již omezena. Proto bývá bisfenol A často nahrazen strukturním analogem, bisfenolem S. Účinek bisfenolu S na vývoj savčích gamet dosud nebyl podroben podrobnému studiu. Studium bisfenolu S je důležité pro objasnění funkce a mechanismů v procesech ovlivňující reprodukci.

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

Na základě dostupných informací byla stanovena hypotéza, že BPS negativně ovlivňuje průběh meiotického zrání a utváření struktur meiotického vřetene oocyty. Cílem práce je ověření této hypotézy. Hodnocen bude vliv BPS na průběh meiotického zrání a změny v expresi a buněčné lokalizaci markeru meiotického zrání – alfa-tubulinu. Pomocí sledování změn v utváření tubulinových struktur bude zmapován vliv bisfenolu S jako endokrinního disruptoru na oogenezi prasete.

3 Literární rešerše

3.1 Oogeneze

Oogeneze je proces, při kterém vznikají samičí pohlavní buňky, oocyty, a zahrnuje celou řadu buněčných transformací (Coticchio *et al*, 2013, Wassarman *et Albertini*, 1994). U prasat, podobně jako u primátů nebo skotu, začíná oogeneze velmi brzy v prenatálním období a je asynchronní. Vývoj oocytů probíhá uvnitř ovariálních folikulů, funkční jednotky vaječníků (Bielańska-Osuchowska, 2006).

Tento proces je obvykle členěn do tří fází: fáze množení, růstu a zrání a je regulován celou řadou faktorů, intra – ovariálních a extra - ovariálních (Cheon, 2012, Sánchez *et Smitz*, 2012). Jde o velmi unikátní děj, jehož cílem je produkce haploidních buněk vysoce specializovaných k oplodnění. (Tosti, 2006).

3.1.1 Fáze množení

Diferenciace a vývoj gonocytů (PGCs - primordial germ cells) je jednou z prvních událostí embryogeneze savců, která je rozhodující pro normální plodnost jednotlivce a zajišťuje správný přenos genomu do další generace. Z PGCs, které se objevují v epiblastu ve druhém týdnu prenatálního vývoje a posouvají se ke stěně žloutkového vaku, vznikají po několika proliferacích oocyty.

Během čtvrtého týdne začínají migrovat ze stěny žloutkového vaku k vyvíjejícím se gonádám, kam dospějí koncem pátého týdne. Migrace zárodečných buněk je zprostředkována pomocí chemotaxe, která je závislá na lokální produkci cytokinů a přeměně růstového faktoru $\beta 1$ (Gosden, 1995). K migraci zárodečných buněk do ovárií dochází u prasete kolem 30. dne vývoje embrya (Eppig *et al.*, 2004).

Po osídlení gonád stoupá počet mitotických dělení. PGCs ztrácejí svou pohyblivost a diferencují se v oogonie (Sadler, 2011). Koncem třetího měsíce se seskupují do shluků (klastrů), obklopených jednou vrstvou epithelových buněk. Zatímco všechny oogonie jednoho shluku pocházejí pravděpodobně z jedné prvopohlavní buňky, ploché epithelové buňky zvané folikulární pocházejí z povrchového epithelu pokrývajícího ovarium (Sadler, 2011).

Oogonie vykazují vysokou frekvenci po sobě jdoucích mitotických dělení (Wassarman, 1988). Mitózu tvoří plynulý sled událostí, ale je rozdělována na pět stádií: profáze, prometafáze, metafáze, anafáze a telofáze. V profázi replikované chromozómy,

každý sestávající ze dvou sesterských chromatid, kondenzují. Vně jádra se tvoří mitotické vřeténko mezi dvěma centrozomy, jež se replikovaly a nyní se pohybují od sebe. Prometafáze začíná náhle rozpadem jaderného obalu. Chromozómy se nyní mohou připojit k mikrotubulům vřeténka svými kinetochory a zahájit aktivní pohyb. V metafázi jsou chromozómy srovnány v ekvatoriální rovině vřeténka uprostřed mezi jeho póly. Párové kinetochorové mikrotubuly na každém chromozómu jsou připojeny k opačným pólům vřeténka. V anafázi se párové chromatidy synchronně oddělují od sebe a tvoří dva dceřiné chromozómy, při čemž je každý z nich pomalu tažen k pólu svého vřeténka. Kinetochorové mikrotubuly se zkracují a póly se oddalují. Oba děje přispívají k separaci chromozómů. Během telofáze se obě sady dceřiných chromozómů dostanou k pólům vřeténka. Tvoří se nový jaderný obal, který uzavírá každou sadu, což znamená tvorbu jader a tedy i konec mitózy. Rozdělení cytoplasmu nastává spolu s tvorbou kontraktálního prstence (Alberts *et al.*, 2005).

Primordiální zárodečné buňky u prasnice jsou v genitální liště přítomny již 18. den po oplození. Počet zárodečných buněk se výrazně zvyšuje až na 5 000 během 20. dne vývoje plodu. K vrcholnému počtu 10 000 buněk dochází k 50. dni vývoje. Od této chvíle mitotická aktivita ustává a část oogonií, jakož i primárních oocytů zaniká (Hunter, 2000).

Proces množení se uskutečňuje během intrauterinního vývoje jedince částečně také v období postembryonálním (Kudláč *et al.*, 1987). Původní dogma reprodukční biologie předpokládalo přeměnu oogonií na primární oocyty pouze v průběhu prenatalního období. To by znamenalo, že zdrojem dospělých samičích zárodečných buněk jsou pouze buňky, které jsou nalézány ve fázi embryonálního vývoje gonád (Wassarman, 1988). Tuto teorii však vyvrátil Johnson *et al.* (2004), který prokázal přítomnost specifických buněk v myších ovarích. Tyto buňky svými vlastnostmi připomínali PGCs a z tohoto důvodu byli označeni jako případní kandidáti pro nahrazení oocytů, které zanikají atrezií. V jiné studii byla jako zásobárna oocytů nalezena tkáň bez přímé návaznosti na funkci vaječníku, kostní dřev. Tyto výsledky vzbudily řadu diskuzí a po vlně rozruchu se uskutečnily další experimenty, které zpochybněly tuto teorii (Eggan *et al.*, 2006, Johnson *et al.*, 2005). Naproti tomu nedávná studie potvrdila vznik oocytů z linie mitoticky aktivních zárodečných buněk izolovaných z vaječníků žen v reprodukčním věku (White, 2012).

Během prenatalního vývoje, když jsou již oogonie obklopeny podpůrnými buňkami, zahajují replikaci DNA a stávají se z nich primární oocyty. Primární oocyty vstupují do meiózy, která probíhá ve dvou cyklech (Wassarman, 1988). Během nich dojde ke snížení počtu chromozómů přesně na polovinu. Tato redukce je nezbytná, protože splynutím dvou

gamet (vajíčka a spermie živočichů) při oplození dojde k obnovení diploidního počtu chromozómů v buňkách embrya (Alberts *et al.*, 2005).

První meiotické dělení u prasat je zahájeno 40. den vývoje, kdy oogonie jsou v profázi prvního meiotického dělení (Sadler, 2011). Profáze prvního meiotického dělení se skládá z několika fází: leptoténe, zygoténe, pachyténe, diploténe a diakinéze, ve kterých dochází postupně ke kondenzaci a oddělení homologních chromozómů, překřížení nesesterských chromatid (crossing - over) a vzniku rekombinací. Reorganizace genetické informace každého chromozómu v gametě napomáhá vzniku jedinců se zcela novým uspořádáním genů (Alberts *et al.*, 2005).

Primární oocyty zůstávají blokovány v profázi, konkrétně ve fázi diploténe, která je charakteristická síťovitým uspořádáním chromatinu (Sadler, 2011). Oocyty v tomto stádiu setrvávají v tzv. prvním meiotickém bloku a před pubertou nedokončují své první meiotické dělení (Liang *et al.*, 2007). U prasete je tento první meiotický blok ukončen vlivem předovulační vlny luteinizačního hormonu (LH) 36-40 hodin před ovulací (Hunter, 2000).

3.1.2 Folikulogeneze a fáze růstu oocyty

Folikulogeneze

Folikulogeneze je charakterizována jako přeměna a postupný vývoj od primordiálních až k atrálnímu ovarialnímu folikulům, ze kterých je následně během ovulace uvolněn zralý oocyt a je bezprostředně spjata s atrézií folikulů (Fair, 2003). Probíhá v kůře vaječnicků, kde se nachází různá vývojová stadia folikulů. Vývoj folikulu je charakterizován zvětšením průměru oocyty a proliferací granulózních buněk (Vanderhyden, 2002).

S folikulogenezí souvisí čtyři regulační mechanismy, kterými jsou nábor primordiálních folikulů (recruitment), vývoj preantrálních folikulů, selekce a vývoj Graafova folikulu a atrézie (Wassarman, 1998). Jen malý počet primordiálních folikulů dozrává a vyvíjí se ve zralý folikul, zatímco zbytek zůstává v klidu (Hirshfield, 1991). U většiny samic savců je po porodu ve vaječnicích přítomno velké množství primordiálních folikulů. Každý z nich obsahuje oocyt, který je zastaven v prvním meiotickém bloku a obklopen jednou vrstvou pregranulózních buněk (Wassarman, 1998).

První fáze folikulogeneze, nábor primordiálních folikulů, pokračuje až do vyčerpání zásob a probíhá kontinuálně během celého reprodukčního života samice (Vanderhyden, 2002). První primordiální folikuly obklopené jednou vrstvou plochých folikulárních buněk

byly pozorovány ve vaječniku prasete 56. den a zůstávají tak až do 90. dne (Bielanska-Osuchowska, 2006). Přeměna plochého tvaru folikulárních buněk v kubický je typickým znakem pro toto období. Poté dochází k syntéze DNA a mitóze granulóznic buněk, kdy se primordiální folikul mění v preantrální (Erickson, 2008). Zásoba preantrálních folikulů na vaječniku je různá mezi druhy, u prasete byla odhadnuta na 21 000 (Paulini *et al.*, 2014).

Preantrální folikul neobsahuje dutinu naplněnou tekutinou a má 2 stádia – primární a sekundární. Zde nedochází ke kontrole pod vlivem gonadotropinů na rozdíl od antrální fáze, kde klíčovou roli hraje luteinizační (LH) a folikuly stimulující hormon (FSH). Pro primární folikul je charakteristický intenzivní růst a mitotické dělení buněk. Rostoucí folikuly podporují růst, dosažení meiotické a vývojové kompetence oocyty (Vanderhyden, 2002). Morfologické změny, které se odehrávají během růstu, mohou být pozorovány ve změnách folikulárního průměru a počtu granulóznic buněk (Sládeček, 1986). V okamžiku, kdy je oocyt obklopen více než jednou vrstvou granulóznic buněk, hovoříme o folikulu sekundárním.

Následuje další fáze folikulogeneze, selekce a vývoj terciálního folikulu (Sládeček, 1986). Od této chvíle folikul označujeme jako antrální. Antrální folikul má dutinu (*antrum folliculi*), vyplněnou tekutinou a v tomto stádiu většina folikulů prochází atretickou degenerací (Paulini *et al.*, 2014). Z počátku je antrum srpkovité, později se rozšiřuje. Do této dutiny promínuje oocyt, obklopený vrstvou folikulárních buněk (*cumulus oophorus*) a vrstva cylindrických folikulárních buněk kolem oocyty tvoří obal zvaný *corona radiata* (Sládeček, 1986).

Když folikul dozraje, náhlý vzestup hladiny luteinizačního hormonu (LH) navodí preovulační růstovou fázi a zralý folikul (Graafův folikul) dosáhne až 25 mm i více. Je obklopen *theca interna*, jež se skládá z buněk s rysy steroidní sekrece a je bohatá na krevní cévy, a *theca externa*, která postupně pokračuje ve vazivo kůry ovaria (Sadler, 2011). Velké množství folikulární tekutiny v dorostlém Graafově folikulu umožňuje jeho snadnou detekci na povrchu vaječniku (Wassarman, 1988).

Proces vývoje folikulů je složitě regulovaný děj, který je řízen především endokrinními faktory, FSH a LH (Vanderhyden, 2002). Receptory pro FSH jsou v primordiálních folikulech granulózní buňky (Senbon *et al.*, 2003). Při nedostatku FSH nedojde k dostatečnému růstu folikulů a nemůže tedy dojít k ovulaci. Tyto folikuly podstupují apoptózu či atrezii. Ve skutečnosti více než 99,9 % folikulů přítomných při narození nikdy nepodstoupí ovulaci a atretizují (Vanderhyden, 2002). Aktivované primární folikuly u prasat

vyžadují přibližně 84 dní na přeměnu na antrální folikuly a dalších 19 dní růstu na preovulační velikost, která dosahuje 10 mm (Morbeck *et al.*, 1992).

Fáze růstu

Během každého estrálního cyklu pod vlivem gonadotropinů vstupuje vždy několik primárních oocytů do fáze růstu (Wassarman, 1988). Růstové fáze oogeneze, je velice výrazná a vede k obrovskému zvětšení oocytu, který může dosáhnout mnohdy makroskopických velikostí (Sládeček, 1986).

Rostoucí oocyt syntetizuje zejména velké množství RNA, a to převážně (asi 95%) ribozomální RNA (rRNA). Dále syntetizuje proteiny, včetně enzymů využívaných až v počátečních fázích vývoje embrya, glykogen a lipidy (Sládeček, 1986). Syntéza makromolekul slouží především k vývoji, růstu a zrání oocytu (Wassarman *et* Albertini, 1994). Na povrch oocytu vylučují granulózní buňky za účasti oocytu glykoproteiny, které vedou k tvorbě *zony pellucidy*. *Zona pellucida* je prostoupena mikrokly oocytu a dlouhými výběžky buněk *corona radiata* (Sadler, 2011). Součástí rostoucího oocytu jsou kumulární buňky, které vysílají do *zona pellucida* silnější výběžky, jež zapadají mezi mikrokly plazmatické membrány oocytu. Tyto výběžky jsou důležité nejen pro transport látek z folikulárních buněk do oocytu, ale jsou také opatřeny mezibuněčnými spoji typu *gap junction* (Sadler, 2011).

Gap junction zprostředkovávají komunikaci mezi povrchem membrány oocytu a kumulárními buňkami. Jsou složeny z proteinů známých jako konexiny a usnadňují převod aminokyselin, glukózy a nukleotidů do rostoucího oocytu. Některé studie prokázaly významnost těchto spojů nejen během růstu, ale i během celého vývoje a zrání (Fair, 2003). Dále plní funkci druhých posílů, důležitých signálů inhibičních a stimulačních, uplatňujících se během meiotického zrání (Hurk *et* Zhao, 2004).

Toto období zahrnuje i výrazné strukturální změny. Dochází především k morfologickým změnám a zvýšenému počtu mitochondrií a ribozómů. Dále se zvyšuje počet granulózních buněk, které se mění z plochých na kubické (Wassarman *et* Albertini, 1994). V růstové fázi se jádro primárního oocytu rovněž velmi zvětšuje a vytváří tzv. zárodečný váček (Sládeček, 1986). Pro pokračování meiózy, tedy prolomení prvního meiotického bloku jsou nezbytné proteiny, které se syntetizují v průběhu růstu (Wassarman, 1988). Na konci růstového období syntetická aktivita oocytu v podstatě ustává, včetně syntézy RNA (Sládeček, 1986).

Meiotická kompetence

Schopnost oocyty znovu zahájit a také dokončit meiotické zrání se nazývá meiotická kompetence (Schramm *et* Bavister, 1999). Meiotická kompetence oocyty je závislá na mnoha procesech v průběhu celé oogeneze, zejména na velikosti oocyty (Marteil *et al.*, 2009). Vývojové kompetence oocyt dosahuje postupně během maturace a růstu, toto platí jak během růstu v *in vitro* podmínkách, tak v *in vivo*. Oocyty meioticky nekompetentní se označují oocyty před vznikem antrální dutiny (Lonergan *et al.*, 1994). Po dosažení pohlavní zralosti jedince získávají oocyty během své růstové fáze schopnost zahájit GVBD, kondenzovat chromatin a pokračovat v meiotickém cyklu, nejsou však schopné dokončit meiotické zrání (Mermillod *et al.*, 1999; Mermillod *et al.*, 2008). Pouze oocyty s ukončeným růstem se následně stávají plně meioticky kompetentní, tedy schopné dokončit meiotické zrání (Wassarman *et* Albertini 1994). Některé důkazy naznačují, že akvizice meiotické kompetence je závislá na čase, nikoliv na přítomnosti folikulárních buněk. V této souvislosti je zřejmé, že přechod z G fáze do M fáze buněčného cyklu je regulována cytoplazmatickým faktorem tzv. zrání podporující faktor (MPF), který se objevuje během meiotického zrání oocyty (Wassarman *et* Albertini 1994).

Oocyt prasete o vnitřním průměru 110 μm je pouze částečně kompetentní. Většina takovýchto oocytů zastaví své zrání v podmínkách *in vitro* ve stádiu metafáze I. Oocyty s průměrem 120 μm jsou již zcela meioticky kompetentní (Motlík *et al.*, 1984).

3.1.3 Zrání oocyty

Zrání oocytů je obvykle definováno jako období přechodu od prvního do druhého meiotického bloku. Přechod mezi těmito fázemi je umožněn díky rozpadu zárodečného váčku (GVBD), kterému předchází ukončené stádium diktyotene. GVBB je jasně viditelná známka znovuzahájení meiózy. Toto období je někdy označováno také jako prometafáze. Znovuzahájení meiózy *in vivo* podmínkách je spuštěno preovulační vlnou LH a v této době je oocyt obklopen kompaktní kumulární vsrtvou (Tosti *et al.*, 2013). Izolovaný oocyt v *in vitro* podmínkách podstupuje meiotické zrání spontánně po uvolnění z folikulu a přerušení komunikace s kumulárními buňkami (Wassarman, 1988). U prasat trvá zrání přibližně 44 – 48 hodin v *in vitro* podmínkách (Hurk *et* Zhao, 2004).

Dokončení prvního meiotického dělení probíhá stejně jako normální mitotické dělení. Během metafáze prvního zracího dělení se bivalenty připojují k meiotickému vřetenku a seřazují se v metafázní destičce. Před rozpadem jaderného obalu a uspořádání chromozómů do metafázní destičky se každý zreplikovaný chromozóm páruje se svým homologem

za vzniku bivalent, která obsahuje čtyři chromatidy. To je stádium první profáze meiózy. V anafázi se oba zreplikované chromozómy oddělují a jsou taženy k opačným pólům. Protože jsou sesterské chromatidy stále pevně spojeny a pohybují se jako celek, každá dceřiná buňka získá dvě kopie maternálního nebo paternálního homologu každého páru (Alberts *et al.*, 2005).

Tedy výsledkem meiózy I je vydělení dědičné informace na polovinu. Vzniká sekundární oocyt, který získá většinu cytoplazmy, a první pólové tělísko, které nezíská praktickou žádnou cytoplazmu. První pólové tělísko leží mezi *zona pellucida* a buněčnou membránou sekundárního oocyty v perivitelním prostoru (Sadler, 2011). Tvorba gamet tedy nyní může pokračovat druhým meiotickým dělením, ve kterém již nedochází k replikaci DNA. Druhé meiotické dělení je prakticky totožné s mitózou. Oocyty vstupují do stádia metafáze II, kde je meióza spontánně zastavena a toto období je označováno jako II. meiotický blok (Wassarman, 1988). Zrání oocyty je tedy poslední fází oogeneze, respektive od vývoje oocyty od profáze I do metafáze II.

Zrání oocyty zahrnuje koordinované jaderné a cytoplazmatické modifikace. Jedná se o velmi složité procesy a jejich souhra je regulována řadou postupných molekulárních událostí (Tosti, 2006). Cytoplazmatické zrání zahrnuje jak morfologické, tak funkční změny, které umožní oocyty dokončit jaderné zrání. Ovšem jaderné a cytoplazmatické zrání jsou dvě události, které jsou na sobě fyziologicky nezávislé. Jde o důležité procesy, během nichž oocyty ukládají zásobní látky, které jsou předpokladem pro oplození, embryonální a fetální vývoj (Krisher, 2004).

Reorganizace buněčných organel je jedním z nejdůležitějších bodů zrání. Organely jako například mitochondrie, dále mRNA a proteinové komplexy nacházející se na periferiích nezralého oocyty, jsou přemístěny do oblasti potřebných pro jejich specifickou činnost (Landim-Alvarenga *et Maziero*, 2014). Tento pohyb umožňují cytoskeletární mikrotubuly a mikrofilamenta (Ferreira *et al.*, 2009). Dále dochází ke zvýšení množství mitochondrií a akumulaci ribozómů a endoplazmatického retikula (Fulka *et al.*, 1998).

Dokončení jaderného a cytoplazmatického dělení probíhá uvnitř vejcovodu, konkrétně v jeho distální části (England *et von Heimendahl*, 2010), pod vlivem vzrůstající hladiny progesteronu (Songsasen *et Wildt*, 2007). U prasat trvá jaderné zrání přibližně 44 hodin (Hurk *et Zhao*, 2004). Další pokrok meiózy je závislý na aktivačním stimulu, který způsobuje rozklad a inaktivaci molekul zodpovědných za udržování meiotického bloku ve stádiu metafáze II (Yanagimachi, 1988). Po fertilizaci nebo partenogenetické aktivaci oocyty pokračují v meióze (Sun *et Nagai*, 2003).

Meióza II je dokončena pouze tehdy, je – li oocyt oplozen. Jestliže nedojde k oplození, buňka degeneruje přibližně za 24 hodin po ovulaci (Sadler, 2011).

3.2 Regulace meiotického zrání

Meiotické zrání savčích oocytů je regulováno řadou mechanismů (Mehlmann, 2005). Mezi hlavní regulační faktory komplikovaného a souhrnného procesu meiotického zrání oocytu patří proteinové kinázy MPF, MAPK a další významné molekuly jako cykliny a signální molekuly (Tian *et al.*, 2002).

3.2.1 MPF

Jedním z nejdůležitějších faktorů, který se podílí na rozpadu zárodečného váčku, obnovení meiózy a vystoupení z prvního meiotického bloku je M-fázi podporující faktor MPF (Tosti *et al.*, 2013). Masui *et al.* (1971) získali výsledky, kterými dokázali existenci MPF v oocytech žaby skokana levhartího (*Rana pipiens*) a tím položili základy pro výzkum zrání oocytu. Jedná se o heterodimer, který je složen z katalytické a regulační podjednotky. Katalytickou podjednotku tvoří cyklin dependentní kináza – CDK 1 a regulační podjednotku cyklin B (Fulka *et al.*, 1998, Meinecke *et al.*, 2001).

Spojením obou podjednotek je vytvořen pouze neaktivní komplex, který je přítomen v růstové fázi oocytů a nazývá se pre-MPF. MPF – kináza nemůže fungovat sama o sobě. Pro svou funkci musí mít navázaný specifický cyklin. Jeho koncentrace narůstá postupně v průběhu interfáze, zatímco cyklin dependentní kináza se aktivuje na konci interfáze. Z toho vyplývá, že přítomnost cyklinu je pro aktivaci nezbytná, ale není to jediný potřebný mechanismus. Aby byla kináza enzymaticky aktivní, musí být fosforylována na jednom nebo více místech a defosforylována na jiných. Odstranění inhibičního fosfátu specifickou proteinfosfatázou na konci interfáze je krok, který vede k aktivaci kinázy (Alberts *et al.*, 1998). Na aktivaci MPF se také podílí cAMP, jestliže přísun cAMP přetrvává, brání svou hladinou aktivaci MPF (Dekel *et al.*, 1988). Všechny tyto reakce jsou zásadní pro podporu úspěšného oplození a vývoj embrya (Hunter, 2000).

Aktivní komplex fosforyluje klíčové buněčné proteiny bez katalytické aktivity – cykliny. Fosforylací příslušných proteinů způsobuje MPF kondenzaci chromozómů, rozpad jaderného obalu a reorganizaci mikrotubulů cytoskeletu při tvorbě mitotického vřeténka (Alberts *et al.*, 2005). Syntéza cyklinů začíná ihned po rozdělení buňky a pokračuje po celý

průběh interfáze. V metafázi II je aktivita komplexu MPF na vysoké úrovni a dochází k druhému meiotickému zastavení. Druhý meiotický blok je dokončen po oplození. K inaktivaci MPF a degradaci cyklinu B dochází po přechodu oocyty z metafáze II do anafáze II a telofáze II (Kikuchi *et al.*, 1995).

3.2.2 Cyklické nukleotidy

Mezi významné regulátory meiotického zrání patří cyklický adenosin-3',5'-monofosfát (cAMP), který je produkován buď endogenně v oocytu, nebo přepraven do oocyty z přilehlých kumulárních buněk (Norris *et al.*, 2009). Z kumulárních buněk cAMP přechází do oocyty pomocí *gap junction* (Epigg, 1982). cAMP se podílí na udržení klidové fáze meiózy (Wassarman *et al.*, 1994). Po expanzi kumulárních buněk a přerušení *gap junctions* spojení mezi oocytem a kumulárními buňkami dochází ke snížení koncentrace cAMP v oocytu a k deaktivaci protein kinázy A (PKA), která je závislá na cAMP, a k redukci inhibičních vlivů purinů na udržování klidové fáze meiózy (Picton *et al.*, 1998). Snížená koncentrace cAMP je způsoben potlačením aktivity adenylát-cyklázy a aktivací fosfodiesterázy katalyzující štěpení fosfodiesterové vazby cAMP (Conti, 1998). Nízká koncentrace cAMP setrvává po celý průběh meiotického zrání až do období druhého meiotického bloku v metafázi II (Dekel *et al.*, 1988).

Bylo prokázáno, že na udržení vysoké hladiny cAMP se podílí cGMP (cyklický guanosin – monofosfát) (Vaccari *et al.*, 2009). cGMP stejně jako cAMP přechází z kumulárních buněk do oocyty pomocí *gap junctions* (Norris *et al.*, 2009). Několik prací uvádí, že cGMP udržuje meiotický blok dvěma způsoby. Prvním z nich je, že inhibuje cAMP fosfodiesterázu v oocytu a tím udržuje vysokou hladinu cAMP. Druhým je, že aktivuje cGMP-dependentní kinázu v oocytu (Ratner *et al.*, 1976, Hubbard *et al.*, 1982, Tornell *et al.*, 1990, Vaccari *et al.*, 2009).

3.2.3 Vápenaté ionty

Vápenaté ionty (Ca^{2+}) plní v těle důležitou funkci druhého posla a hrají významnou roli v regulaci meiózy u savců (Petr *et al.*, 2001). Regulace intracelulárního Ca^{2+} má tedy velký biologický význam. Nejvíce intracelulárního Ca^{2+} je vázáno v endoplazmatickém retikulu a jiných organelách. Organely jsou jakousi jeho zásobárnou, ze které pak může být Ca^{2+} mobilizován kanály řízenými ligandem, a tím se koncentrace volného Ca^{2+}

v cytoplazmě zvýší. Zvýšená koncentrace cytoplazmatického Ca^{2+} se váže a aktivuje specifické proteiny vázající kalcium, a ty následně aktivují celou řadu proteinkináz (Gang, 2005).

Kolísání hladiny intracelulárních Ca^{2+} může spontánně aktivovat a regulovat meiotické a cytoplasmatické zrání oocyty. Na základě výsledku některých studií se předpokládá, že vzestup intracelulárních Ca^{2+} iontů spouští rozpad zárodečného váčku (GVBD) u prasečích oocytů (Krisher, 2004).

Vápník je nutný pro výstup z meiotického bloku v metafázi II (MII) u bezobratlých a nižších obratlovců. Nicméně jeho role při aktivaci savčích oocytů je stále nejasná (Tůmová *et al.*, 2016).

3.2.4 MAPK

Mitogen aktivovaná proteinkinázy (MAPK), serin / threonin kinázy, jsou dalšími hlavními regulátory zrání oocytů, u kterých je k jejich plné aktivaci nutná fosforylace threoninových a tyrosinových zbytků. Jsou aktivovány několikastupňovou fosforylační kaskádou kináz (Sun *et al.*, 2002). MAP kinázová kaskáda je regulační dráha funkčně obdobná a interagující s MPF při řízení meiotického zrání oocytů (Fan *et al.*, 2004). MAP kinázy se u prasat vyskytují se v několika izoformách, a to ERK1 a ERK2 (Hunter, 2000).

Aktivace MAPK je zprostředkována pomocí MAP kinázy kinázy, zvané MEK (Fan *et al.*, 2004). U prasečích oocytů stejně jako u skotu je MAPK aktivována v období GVBD a udržují kondenzaci chromozómů. Existuje ovšem již v GV stádiu, ale pouze v inaktivní formě (Sun *et al.*, 2003). Bylo prokázáno, že ke GVBD u prasat dochází i v případě, že je aktivita MAP kináz zablokována prostřednictvím inhibitoru MEK (Tong *et al.*, 2003). U prasat jsou aktivovány před nebo současně s aktivací MPF (Hunter, 2000).

Aktivace MAPK je u jiných živočišných druhů odlišná, například u myších oocytů je MAP kináza aktivovaná asi 3 hodiny po fázi GVBD (Verlhac *et al.*, 1994). U oocytů drápatky je aktivace MAP kináz prokázána ještě před stádiem GVBD (Kosako *et al.*, 1994). MAP kinázy vykazují vysokou aktivitu v průběhu celého zrání, k poklesu dochází až po oplození nebo partenogenetické aktivaci (Sun *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2012).

MAPK fosforyluje cytoskeletární proteiny a jaderné laminy, které hrají klíčovou roli během meiotického dělení (Hunter, 2000). Fosforylací způsobuje kondenzaci chromozómů, rozpad jaderného obalu a reorganizaci mikrotubulů cytoskeletu při tvorbě mitotického

vřeténka (Alberts *et al.*, 1998). Dále u oocytů drápatky se zapojují do přenosu signálu pro zrání z cytoplazmy do jádra a indukují znovuzahájení meiózy (Stojkovic *et al.*, 1999). Inhibice MAP kinázy v době přechodu z meiózy I do meiózy II vede k selhání tvorby dělicího vřeténka a k neuvolnění prvního PB (Sun *et Nagai*, 2003). Hladina MAP kinázy se plynule zvyšuje do metafáze II a zůstává vysoká i během uvolnění prvního PB. MAP kináza je zodpovědná za druhý meiotický blok (Hunter, 2000).

3.3 Endokrinní systém

Endokrinní systém je považován za jeden z řídicích systémů těla živočichů a jeho produkty (hormony) pomáhají přenášet informace ostatním buňkám. Zajišťuje na nejrůznějších úrovních integritu a činnost organismu vzhledem k neustále se měnícím podmínkám vnitřního a zevního prostředí, a to prostřednictvím řízením: růstu a vývoje, stálosti vnitřního prostředí, přeměny látek na energii a reprodukce. Hlavním transportním médiem hormonů jsou tělní tekutiny (hlavně krev), jimiž se dostávají k cílovým buňkám ze žláz s vnitřní sekrecí. Ovšem pouze buňky s cílovými receptory jsou schopné s hormony reagovat (Hossner, 2005). Mezi žlázy s vnitřní sekrecí řadíme hypotalamus, hypofýzu, epifýzu, štítnou žlázu, příštítná tělíska, srdce, žaludek, játra, Langerhansovy ostrůvky slinivky břišní, kůru a dřev nadledvin, ledviny, kůži a tukovou tkáň. I když humorální regulace probíhá odděleně od nervového systému, oba systémy velmi těsně spolupracují.

3.3.1 Endokrinní disruptory

Endokrinní disruptory (EDCs) jsou chemické látky exogenního původu: přírodní i syntetické hormonálně aktivní látky, které zasahují do těla prostřednictvím interference s endokrinním systémem (Griffith *et Stuehr*, 1995). Pro pochopení účinků EDCs významně napomáhá experimentální testování na buněčných, tkáňových kulturách a zvířecích modelech. Byly zjištěny evidentní poruchy imunitního systému, nárůst zhoubného bujení, změny chování, zpomalení růstu a v neposlední řadě narušení reprodukčních a vývojových schopností (Rogan *et Ragan*, 2003).

Endokrinní disruptory mohou působit jako epigenetické toxikanty, neboť narušují hormonální signálování v buňkách a tkáních. Díky vlastnostem podobným endogenním hormonům se endokrinní disruptory vážou na svůj proteinový cíl, často se jedná o jaderný receptor, následně se celý komplex přesune k DNA. Takto vzniklý komplex, který kontroluje expresi specifických genů, bývá označován jako tzv. genomický (tj. závislé na změnách

v expresi genomové DNA). Jiné studie ovšem prokázaly, že endokrinní disruptory mohou aktivovat také jiné typy membránových receptorů, které přímo kontrolují aktivitu enzymů či iontových kanálů. Tyto signální procesy jsou označovány jako negenomické, jelikož nejsou závislé na změnách genové exprese způsobených interakcí aktivovaného hormonálního receptoru s genomovou DNA (Watson *et al.*, 2008). Mimo genomických a negenomických účinků endokrinních disruptorů byly popsány také účinky epigenetické, zodpovědné za metylaci a acetylaci DNA (Bromer *et al.*, 2010).

Některé z EDCs vykazují velmi nízkou rozpustnost ve vodě a tucích. To má za následek jejich hromadění v tukové tkáni (Diamanti, 2009). Jejich kumulativní charakter v živých organismech způsobuje nevratné poškození reprodukčního systému a dochází k ohrožení udržitelnosti některých živočišných druhů (Andrea, 2008).

Důležitý v případě disruptorů je věk v době expozice. Vystavení dospělého jedince EDCs může mít velmi odlišné důsledky než vystavení plodu. Během vývoje organismu stačí nízká dávka po kratší dobu a může mít trvalé následky až do dospělosti. U dospělých je zpravidla potřeba vyšší hladina EDCs, aby způsobila trvalé změny na organismu (Diamanti, 2009). EDCs zahrnují širokou škálu látek, mezi nejvýznamější syntetické endokrinní disruptory se řadí některá průmyslová rozpouštědla a jejich produkty (polychlorované bifenoly a polybromované bifenoly), plasty (bisfenol A, bisfenol S, bisfenol F), insekticidy (chlorpyrifos), léčiva (DES) a těžké kovy (Diamanti, 2009, Griffith *et al.*, 1995).

Uvolňování těchto chemických látek do prostředí má negativní dopad na reprodukční funkce u samic i samců. Reprodukční funkce mohou být narušeny na několika místech např.: ovariální funkce během meiotického zrání oocyty, dále může být narušena produkce steroidního hormonu nebo mohou nastat problémy s udržení březosti (Alm *et al.*, 2002, Lemeire *et al.*, 2007).

3.3.2 Bisfenol A

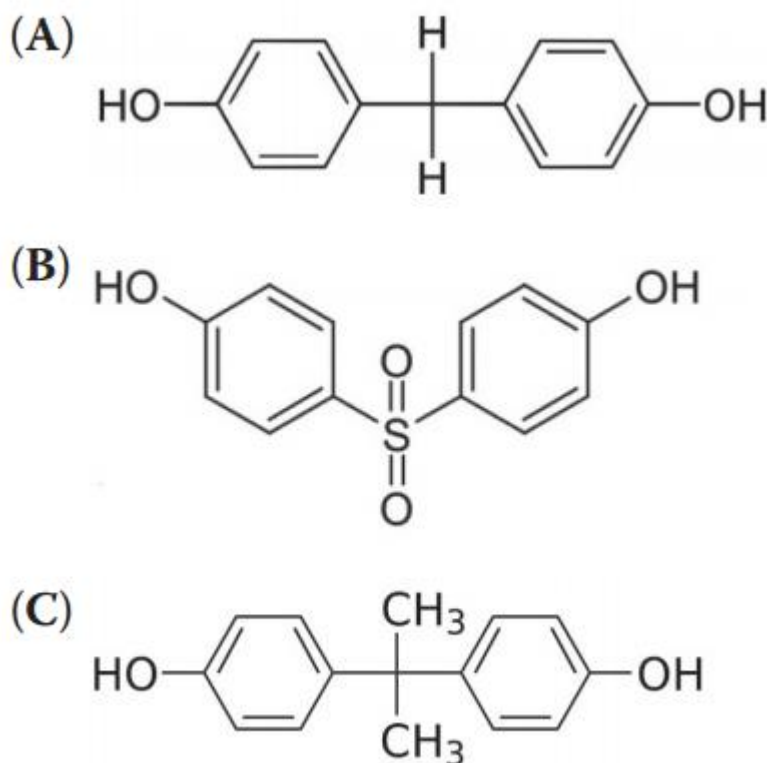
Bisfenol A (2, 2 - bis (4 - hydroxyfenyl) propan) je organická sloučenina vznikající kondenzací dvou fenolových skupin a acetonu. Jde o jednu z nejrozšířenějších syntetických látek na světě a to především díky jejímu využití při výrobě plastů a epoxidových pryskyřic (Usman *et al.*, 2016). V roce 1891 byl poprvé syntetizován a ve 30. letech minulého století byl prověřován během hledání syntetických estrogenů pro lékařské účely (Rubin, 2011). Ročně se BPA vyprodukuje po celém světě více než 3,5 miliardy tun (Vandenberg *et al.*, 2010). Jednou z vlastností BPA je jeho lipofilita, a z toho důvodu má tendenci akumulovat

v organismech. Bioakumulační faktory jsou však obecně vyšší u bezobratlých, než u obratlovců (Oehlmann *et al.*, 2009).

Bylo zjištěno, že polymerací BPA vzniká pevný plast, zvaný polykarbonát, který našel uplatnění při výrobě takřka všech plastů, které jsou předmětem denní potřeby člověka jako např. plastové hračky, sáčky, láhve včetně kojeneckých, lékařská zařízení, plechovky a zubní výplně (Vogel, 2009, Fenichel *et al.*, 2013, Rubin, 2011). Příčiny kontaminace BPA v životním prostředí jsou tedy především antropogenní.

Několik studií ukázalo, že BPA se uvolňuje po opotřebenosti ze spotřebních výrobků např. z konzerv s vnitřním nátěrem epoxidových pryskyřic, což vede k jeho detekci v potravinách (Křesinová a spol., 2009). Dále ho můžeme nalézt v pitné a odpadní vodě, vzduchu a prachu (Vandenberg *et al.*, 2007). Navíc, následující studie identifikovaly BPA v lidském séru, moči, placentární tkáni a pupečnickové krvi a v mnoha lidských tekutinách a tkáních spojených s reprodukcí: folikulární tekutina (1,5 – 2, 4 ng/ml), plodová voda (1 - 17 ng/ml), placentární tkáň (11,2 ng/ml) a mateřské mléko (0,28 – 1, 9 ng/ml) (Dekant *et Völkel*, 2008, Vandenberg *et al.*, 2010, Choi *et al.*, 2016).

Do těla BPA vstupuje pozřením, vdechnutím nebo může být také absorbován kůží (Brontons *et al.*, 1995). Největší podíl na celkovém množství přijatých endokrinních disruptorů má strava. Ta tvoří přibližně 90 % (Furst 2006, Hites *et al.* 2004).



Obrázek 1: Chemická struktura bisfenolu A (A), bisfenolu S (B), bisfenolu F (C) (Žalmanová *et al.*, 2016).

3.3.2.1 Účinky bisfenolu A na savčí organismus

Účinky BPA v organismu jsou předmětem zájmu mnoha studií a existuje přes 100 nezávislých studií, které dokazují jeho dopad na zdraví. Jeho účinky byly testovány na mnoha zvířecích modelech. Níže jsou uvedeny některé z nich.

Bisfenol A můžeme zařadit mezi xenoestrogeny. Jde o látky vykazující estrogení aktivitu, které nejsou přirozenou součástí endokrinního systému a označují se jako environmentální (exogenní) estrogeny. Podle původu se rozdělují na fytoestrogeny (rostlinného původu), mykoestrogeny (produkty některých plísní) a xenoestrogeny (antropogenní zdroje) (Kujalová a kol., 2007). BPA může napodobovat aktivitu estrogenu a tím způsobuje reprodukční toxicitu a ovlivňuje buněčný cyklus (Golden *et al.*, 1998; Morrissey *et al.*, 1987; Takai *et al.*, 2000). Biochemické testy prokázaly, že BPA se váže k oběma estrogenovým receptorům, alfa (ERA) a beta (ERB), s přibližně 10 x vyšší afinitou k ERB (Kuiper *et al.*, 1998, Pennie *et al.*, 1998).

I když potenciální nežádoucí účinky nízkých koncentrací BPA na reprodukci jsou stále předmětem diskuse. Většina studií naznačuje, že BPA je ovarialně toxická látka, nejen, že postihuje celkovou morfologii a hmotnost vaječníků, ale také prokazatelně snižují kvalitu oocytů. Studie *in vitro* a *in vivo* poskytují důkazy, že BPA negativně ovlivňuje nástup meiózy a folikulogeneze jak u zvířat, tak u lidí (Eichenlaub-Ritter *et Pacchierotti*, 2015, Peretz *et al.*, 2014). Hladina BPA koreluje u žen se zvýšeným počtem zánětu reprodukčního traktu po menopauze a u mužů se sníženou kvalitou spermií, která může vést až ke sterilitě (Yang *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2011, Allard *et Colaiacovo*, 2010).

U žen má vliv na sekreci gonadotropin uvolňujícího hormonu, hypofýzu, vaječníky, dělohu a prsní žlázu (Patisauel *et al.*, 2006, Ramos *et al.*, 2003, Hunt *et al.*, 2003, Markey *et al.*, 2005, Vandenberg *et al.*, 2007). To může být spojeno s předčasnými a opakujícími se potraty (Cantonwine *et al.*, 2010, Sugiura-Ogasawara *et al.*, 2005). Eichenlaub-Ritter *et Pacchierotti* (2015) ve své práci uvádějí, že vyšší hladiny BPA v moči u pacientek podstupující asistovanou reprodukci, mohou být spojeny s více jak 50 % šancí na selhání implantace, ve srovnání s pacienty s nízkou či nulovou hladinou BPA.

Dále BPA narušuje embryonální vývoj plodu prostřednictvím hormonů štítné žlázy a má negativní dopad na bilanci glukokortikoidů (Heimeier - Shi, 2010, Prasanth *et al.*, 2010). Nedávné studie ukázaly, že vystavení BPA by také mohl hrát roli při vzniku obezity a dalších metabolických syndromů (Zalko *et al.*, 2011). Kromě toho má negativní vliv na vývoj mozku, kdy bylo prokázáno, že BPA zabraňuje maskulinizaci mozku během vývoje plodu a zasahuje do rodičovského chování (Patisauel *et al.*, 2006, Johnson *et al.*, 2015). U člověka může také ovlivnit metylaci DNA. Výzkum prováděný v Egyptě prokázal spojitost mezi zvýšenou hladinou BPA v moči a změnami v metylaci DNA. V tomto případě se zejména jednalo o geny podílející se na imunitních funkcích a metabolismu (Eichenlaub-Ritter *et Pacchierotti*, 2015).

U makaků, kteří byli vystaveni během těhotenství BPA, došlo k četnému nárustu abnormálních folikulů, které obsahovaly více oocytů a dlouhodobá expozice BPA zapříčinila zvýšený výskyt neuzavřených oocytů (Eichenlaub-Ritter *et Pacchierotti*, 2015, Peretz *et al.*, 2014). Podobně tomu tak bylo u neonatálně exponovaných jehňat, kdy nízké dávky BPA způsobily zvýšený výskyt folikulů s větším počtem oocytů (Peretz *et al.*, 2014).

U myši vystavených BPA během meiotického dělení bylo dokázáno, že dochází k hypomethylaci imprintních genů *Igf2r* a *Peg3* během růstu oocytů a zvýší estrogení receptorovou expresi na úrovni mRNA a proteinů (Chao *et al.*, 2012). Expozice březích myší, které byly vystaveni dávčám 400 ng BPA od poloviny březosti až do porodu, vyústila

zvýšeným výskytem rekombinace homologních chromozómů v oocytu. Také bylo prokázáno, že dlouhodobé vystavení účinkům BPA mělo za následek snížený počet mláďat a míru zabřeznutí (Cabaton *et al.*, 2011). Dlouhodobý výzkum pro gestační expozici vyšších koncentrací BPA na myších a potkanech zjistil, zvýšenou tělesnou hmotnost, koncentraci inzulínu v séru, jakož i zhoršenou glukózovou homeostázu (Choi *et al.*, 2016). BPA má také jak bylo v poslední době zjištěno vliv na lipidové složení mléka krysy a tím nepřímo ovlivnit růst potomstva (Choi *et al.*, 2016).

Zvýšená rekombinace byla rovněž pozorována v oocytech makaka rhesus a lidských oocytech ošetřených BPA v *in vitro* podmínkách. V roce 2003 bylo zjištěno, že nízké, ale dlouhodobé vystavení oocytů BPA před zahájení meiózy může vést k jejich aberaci. V jiné studii byl prokázán epigenetický vliv BPA na samčích zárodečných buňkách. Samčí potomci krysy, prenatálně vystaveni BPA, vykazovali snížený počet spermií a další fenotypové změny a to nejen v první generaci, ale až do F3 (Eichenlaub-Ritter *et Pacchierotti*, 2015).

Současná studie identifikovala škodlivý vliv BPA na embrya skotu. Důležitým faktem je, že pokud jsou embrya vystavena vysokým koncentracím BPA, vykazují podstatně zvýšenou spotřebu glukózy a laktátu při vývoji blastocysty, což naznačuje potenciální narušení metabolismu potomků. To podporuje hypotézu, že BPA převážně působí prostřednictvím estrogen – zprostředkovaných drah (Choi *et al.*, 2016). V jiné studii, Veiga-Lopez *et al.* (2013) uvádí, že prenatální expozice BPA změnila plodu ovariální steroidogenní gen a expresi mikroRNA, které zprostředkovávají gonadální diferenciaci a folikulogenezi u ovcí.

Uvedené studie prokázaly, že BPA má účinky na vytváření cytoskeletu, epigenetické změny, oxidační stres, autofágie a apoptózu prasečích oocytů (George *et al.*, 2008). Na závěr lze tedy říci, že nízké koncentrace BPA nepříznivě ovlivňují epigenetiku savčích zárodečných buněk, což má dopad na genovou expresi, rozvoj a kvalitu oocytu. Škodlivé účinky od zranění pohlavních buněk až do dospělosti (Choi *et al.*, 2016).

Tato skutečnost vyvolala veřejné obavy a regulační orgány jako například Evropská komise zakázala používat tyto látky. Proto bylo používání BPA v řadě lidských oborů omezeno. Jako alternativa za BPA je často volen bisfenol S (BPS) nebo také bisfenol F (BPF). Na základě studií byl BPS považován za “ bezpečnější“ z důvodů jeho značně nižší estrogenní aktivitě, stabilitě vůči vysokým teplotám a odolnosti vůči slunečnímu záření. Jeho výroba roste každým rokem. Ovšem dle nově získaných poznatků vyplývá, že BPS není zdaleka bezpečná látka a má podobné účinky na organismus jako BPA. Jelikož je BPS daleko hůře degradovatelný než BPA, působí v organismu delší dobu. Qiu *et al.* (2015) jako model

pro zkoumání dopadu endokrinních disruptorů použili *zebrafish*. Ve své práci dokazují, že BPA a BPS mají negativní dopad na embryonální vývoj ryb. I nízké expozice BPA způsobily rychlejší líhnutí a časnější nástup puberty. Kromě toho dlouhodobější vystavení BPA v raném stádiu vývoje může mít ekologický dopad na zdraví a velikost populace ryb. Z uvedené studie vyplývá, že účinky BPA závisí na době expozice.

3.3.3 Bisfenol S

Bisfenol S (BPS) je toxická látka, která se v současné době velice často používá jako náhrada pro BPA, protože tato látka nepodléhá přísným regulačním omezením jako její předchůdce. BPS je bisfenol, ve kterém je dimethylmethylen skupina ($C(CH_3)_2$) nahrazena sulfonovou skupinou (SO_2). Vzhledem k strukturální podobnosti s BPA, je pravděpodobné, že BPS může mít podobné negativní účinky na endokrinní systém (Bouche *et al.*, 2016). Bisfenol S má větší poločas rozpadu a lépe proniká do kůže než BPA, čímž může způsobit větší tělesnou zátěž než BPA (Jin *et Zhao*, 1997).

Bisfenol S se používá jako činidlo v čisticích prostředcích, déle při výrobě kosmetiky (např.: make – up, mýdla, deodorant, pleťová voda, zubní pasta, šampóny a kondicionéry), papíru (např.: bankovky, letáky, vstupenky, účtenky z pokladen a obálky) a stejně jako BPS při výrobě plastových lahví. Detekován byl i v potravinách (např.: mléčné výrobky, maso, zelenina, konzervované potraviny a obiloviny) a prachu v domácnostech. V nižších koncentracích než BPA byl objeven také v povrchové vodě, sedimentech a odpadní vodě (Rochester *et Bolden*, 2015). Studie Liao *et al* (2012) indikují výskyt BPS ve vzorcích lidské moči. Díky jeho širokému uplatnění stoupá poptávka a výroba s každým rokem roste (Liu, 2005).

Jakmile BPS vstoupí do těla, naváže se na lidský sérový albumin (HSA), jeden ze základních proteinů oběhového systému, a touto vazbou může způsobit změny ve struktuře proteinů a narušit jejich funkce (Mathew *et al.*, 2014).

3.3.3.1 Účinky bisfenolu S na savčí organismus

Několik studií ukázalo, že BPS významně narušuje endokrinní činnost, ovšem o jeho účincích na endokrinní systém zvířat *in vivo* se toho stále příliš neví (Naderi *et al.*, 2014).

Přestože se BPS váže na estrogenové receptory slaběji než estradiol, jeho účinky jsou srovnatelné (Watson *et al.*, 2005). Naopak některé metabolity BPS mohou mít větší efekt než samotný estrogen (Ben-Jonathan *et Steinmetz*, 1998). BPS má širší spektrum účinku a interaguje i s estrogenům příbuzným receptorem γ , glukokortikoidním receptorem (GR), androgenním receptorem (AR), thyroïdním receptorem (TR) nebo pregnanovým X receptorem (Kruger *et al.*, 2008).

O vlastnostech BPS ve vodním prostředí se ví stále málo. Teprve v nedávné studii bylo prokázáno, že by BPS mohl narušit rovnováhu pohlavních steroidních hormonů a tím narušit normální funkci reprodukce. Ji *et al.* (2013) studovali expozici BPS u dávná pruhovaného a zjistili sníženou hmotnost pohlavních žláz a narušenou reprodukci (tj. snížení produkce jiker, prodlouženou dobu líhnutí a zvýšený výskyt embryonálních malformací). Je známo, že rané životní stádium ryb je nejvíce náchylné k účinkům EDCs. V tomto období i velmi nízké koncentrace BPS hrají zásadní roli v sexuální diferenciaci, metabolismu, embryologickém růstu, vývoji a osmoregualci. Je dobře zdokumentováno, že chronické expozice způsobuje hormonální dysbalance a mohou vést k následkům u dospělců jako je např.: intersex (Naderi, 2014). V dalších experimentech bylo prokázáno, že BPS působí cytotoxicky, mutagenicky a genotoxicky (Fic *et al.*, 2013).

V současné době jsme svědky střídání BPA a BPS v celé řadě materiálů a BPS se stává standartní součástí několika produktů. Je třeba velmi intenzivního výzkumu a následné legislativní opatření, aby bylo zajištěno, že BPS nebude mít výrazné negativní dopady na životní prostředí a na lidské zdraví, včetně negativních vlivů na reprodukci.

4 Materiály a metodika

4.1 Získávání kumulo-oocytárních komplexů

Kumulo-oocytární komplexy (COCs) byly získávány z vaječníků poražených necyklujících prasniček z jatek (Jatky Český Brod a Příbram, Česká Republika). Odebrané vaječnky byly udržovány při fyziologických 39 °C a dopraveny do laboratoře. Folikulární tekutina byla získána aspirací pomocí jehly 20G. Poté byla folikulární tekutina vytlačena z injekční stříkačky do Petriho misky. Tenkou skleněnou pipetou byly z folikulární tekutiny pod binolupou vybrány oocyty s nepoškozenou cytoplazmou a souvislou vrstvou kumulárních buněk.

4.2 Kultivace oocytů v podmínkách in vitro

Zrání vybraných COCs probíhalo v in vitro podmínkách v modifikovaném médiu M199 (složení viz tabulka č. 1) s přidavkem 5% fetálního séra a gonadotropních hormonů - 13.5 IU eCG: 6.6 IU hCG/ml (P.G.600 Intervet, Holandsko) po dobu 48 hodin do stádia druhé meiotické metafáze, v podmínkách řízené atmosféry 39°C a 5% CO₂. V experimentální skupině byly přidány do kultivačního média zvolené koncentrace bisfenolu rozpuštěného v DMSO (finální koncentrace BPS v kultivačním médiu byly: 3nM, 300nM a 30μM). Oocyty v kontrolní skupině byly kultivovány v kultivačním médiu bez přidavku BPS.

Tabulka 1: Složení modifikovaného kultivačního média M199

Složka	Množství v 100ml média M199
HEPES (Sigma-Aldrich, Německo)	150 mg
Pyruvát sodný (Sigma-Aldrich, Německo)	25 mg
Gentamicin (Sigma-Aldrich, Německo)	2,5 mg
Laktát sodný (Sigma-Aldrich, Německo)	60 mg
Bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich, Německo)	50 mg

4.3 Imunocytochemie

Po kultivaci byly z oocytů odstraněny kumulární buňky a pomocí 0,5% pronázy byly oocyty zbaveny vstvy *zona pellucida*. Následně byly opláchnuty ve čtyřech kapkách T1-HEPES-PVA (viz tabulka č. 2). Po oplachu následovalo přemístění vzorků do 400 μ l PBS- NaN_3 (složení viz tabulka č. 3).

Dále byly oocyty fixovány v 4 % roztoku paraformaldehydu při laboratorní teplotě po dobu 40 minut. Poté byly oocyty opláchnuty ve dvou kapkách PBS- NaN_3 . Poslední oplach lze využít i pro skladování oocytů při teplotě 4°C až do dalšího zpracování. Takto nafixované oocyty byly dále permeabilizovány v 0,1% TritonX-100 v PBS- NaN_3 při laboratorní teplotě po dobu 40 minut a následně blokovány v 5% NGS (normal goat serum, Sigma Aldrich) s 0,1% TritonX-100 v PBS- NaN_3 po dobu 25 min.

Přes noc byly oocyty inkubovány s primární protilátkou anti α -tubulin (T6199, Sigma-Aldrich) ředěnou v 1% NGS s 0,1% TritonX-100 v PBS- NaN_3 v poměru 1:200 při teplotě 4°C. Následující den byly oocyty promyty dvakrát za sebou v 1% NGS s 0,1% TritonX-100 v PBS- NaN_3 a inkubovány se sekundární protilátkou anti-mouse IgG-FITC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 1:200) konjugovanou s 4'6'-diamidino-2-fenylyndolem (DAPI, D-1306, Thermo Fisher Scientific) po dobu 40 minut.

Poté došlo opět k dvojitému oplachu v 1% NGS (G9023, Sigma-Aldrich) s 0,1% TritonX-100 v PBS- NaN_3 . Negativní kontrola oocytů byla inkubována pouze v čistém 1 % NGS s 0,1 % TritonX – 100 v PBS- NaN_3 bez primární protilátky.

Po oplachu byly oocyty montovány v kapce Vectashieldu na teflonová podložní skla, překryty krycím sklíčkem. Pro zafixování krycího sklíčka byl použit bezbarvý lak. Takto připravené vzorky mohou být krátkodobě skladovány při 4°C do prohlédnutí na konfokálním mikroskopu.

Tabulka 2: Složení T1-HEPES-PVA (Oocyte Wash Medium)

Složka	Množství v g/1000ml
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
Penicilin G (PENK, S-A)	0,0650
PVA	0,1000

Tabulka 3: Složení PBS- NaN₃

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

4.4 Analýza obrazu

Oocyty po imuncytochemické analýze byly snímány na konfokálním skenovacím mikroskopu (Leica, SPE, Germany) při 400x zvětšení. Nastavení expozice bylo v každém experimentu, stejně jako negativní kontrola, u které nebyla použita primární.

4.5 Statistická analýza

Data jsou získána nejméně ze tří opakování a prezentována jako \pm SEM. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu SAS 9.3 (SAS institute Inc., USA) za použití generálního lineárního modelu (GLM) a Shapiro-Wilkinsonova testu normality. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami byly stanoveny pomocí Scheffého testu na hladině významnosti $P < 0.05$. V experimentu byl použit celkový počet 82 oocytů a byl třikrát zopakován.

5 Výsledky

5.1 Ověření účinků BPS na tvorbu meiotického vřetena v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů

Cílem experimentu bylo zjistit abnormality meiotického vřetene pod vlivem BPS v dozrálých MII oocytech po 48 hod. in vitro kultivace. Byly vytvořeny čtyři skupiny oocytů: 1) kontrolní skupina oocytů kultivována v kultivačním médiu bez přidaného BPS, 2) oocyty kultivované v kultivačním médiu s koncentrací 3nM BPS, 3) oocyty kultivované v kultivačním médiu s koncentrací 300nM BPS, 4) oocyty kultivované v kultivačním médiu s koncentrací 30μM BPS. Mikrotubuly jsou na snímcích značeny zelenou fluorescenční barvou, zatímco chromozomy jsou zviditelněny barvením DAPI (modrá). Měřítka zobrazení snímku bylo použito 10.

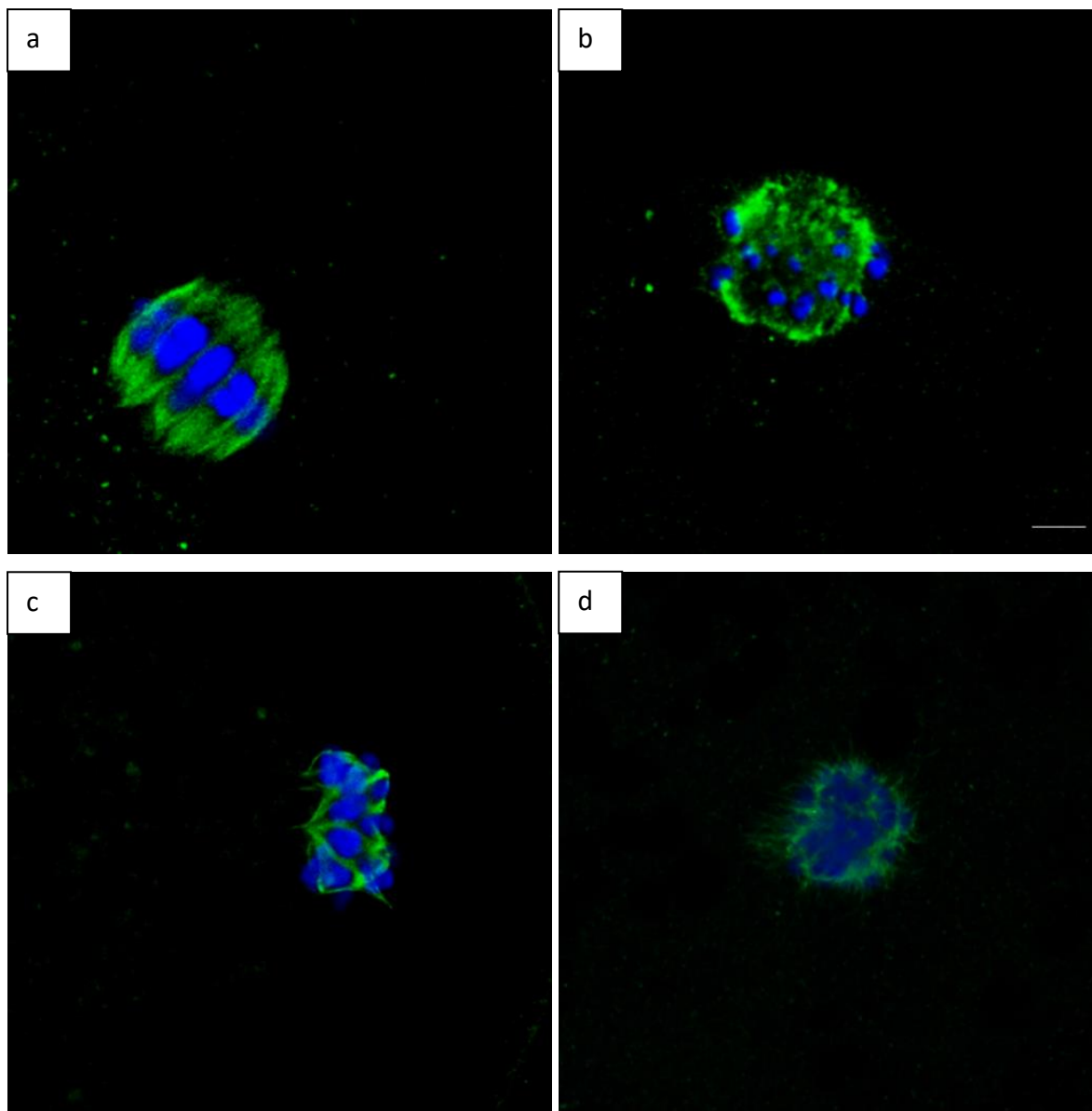
Obrázek číslo 2a představuje kontrolní skupinu, tedy skupinu oocytů s nulovou koncentrací BPS, kdy metafázní vřeteno má typický tvar, který představuje klasické uspořádání u oocytů po 48 hodinách kultivace, dosahují tedy metafáze II. Chromozomy jsou připojeny k mikrotubulům vřeténka svými kinetochory a jsou již uspořádané do ekvatoriální roviny mezi jednotlivými póly. Pouze 3,3 % v kontrolní skupině došlo k výskytu abnormalit během uspořádání meiotického vřetene do ekvatoriální roviny. Veškeré hodnoty směrodatných odchylek pro daný experiment jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Obrázky č. 2b, 2c a 2d reprezentují nepravidelné uspořádání metafázní figury a vzniku nepravidelností, ke kterým došlo pod vlivem BPS. Obrázek č. 2b představuje skupinu oocytů při 3nM koncentraci BPS, což poznamenalo jejich strukturu. Při této koncentraci BPS se ve 20 % oocytů objevilo nepravidelné uspořádání při navazání chromozómů k mikrotubulům. Mezi takto nízkou koncentrací BPS a kontrolní skupinou neexistuje statisticky významný rozdíl během organizace chromozómů, stejně tomu tak je i při koncentraci 300nM BPS.

Koncentrace 300nM BPS jsou zobrazeny na obrázku č. 2c, kdy 39,7 % oocytů se vyvíjelo abnormálně. Můžeme pozorovat změny jako je například zkrácení mikrotubulů. Mezi kontrolou a 300nM BPS existuje statisticky významný rozdíl v utváření meiotického vřetene, ovšem statisticky významné rozdíly se skupinou oocytů v koncentraci 3nM BPS a 30μM BPS nebyly zaznamenány.

Obrázek č. 2d prezentuje koncentrace 30μM BPS, kdy 46,7 % nedosáhlo správného uspořádání chromozómů, kdy došlo k vytvoření nepravidelných figur. Můžeme pozorovat nabobtnání vláken a k nenavázání chromozómů k mikrotubulům. Tato skupina oocytů vykazuje statisticky průkazné rozdíly oproti kontrole a koncentrací 3nM BPS.

Náš výzkum prokázal, že oocyty vystaveny BPS vykazují abnormality v utváření meiotického vřetene. Došlo k nabobtnání, zkrácení vláken a vzniku nepravidelných figur. Statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami můžeme pozorovat mezi kontrolou a koncentracemi 300nM a 30 μ M, ovšem koncentrace 3nM nevykazuje staticky významný rozdíl s kontrolou. Dále nepozorujeme změny mezi koncentracemi 3nM a 300nM, stejně tak u skupin oocytů s koncentrací BPS 300nM a 30 μ M.



Obrázek 2: Imunocytochemická lokalizace meiotického vřeténka u oocytů kultivovaných *in vitro* po dobu 48 hodin: a – kontrolní skupina oocytů, b – 3nM BPS, c – 300nM BPS, d - 30 μ M BPS.

Tabulka 4: Procentuální zastoupení abnormalit α – tubulinu po 48 hodinách kultivace

Koncentrace BPS	Abnormality α – tubulinu (%)
Kontrola	3.3. \pm 3.3
3nM	20.0 \pm 11.5
300nM	39.7 \pm 3.2
30 μ M	46.7 \pm 3.3

6 Diskuse

Během meiotického dělení u savců dochází ke dvěma po sobě jdoucím dělením, v průběhu kterých dochází k řadě důležitých dějů. Tyto děje jsou závislé na složitě regulovaných klíčových mechanismech. Mezi nepostradatelné patří správná organizace dělicího vřeténka (Sun *et* Nagai, 2003). V buňkách je shromáždění dělicího vřeténka zajišťováno centrozómy, které fungují v podobě primárních mikrotubulárních organizačních center (MTOCs, primary microtubule organizing centers). Chromozómy během metafáze II vytvářejí spolu s MTOCs metafázní destičku. Pericentrin, protein v myších oocytech, který je hlavní složkou acentriolárního MTOCs, způsobuje při jeho nedostatku narušení organizace meiotického vřetene, které vede k aneuploidii. Oocyty u savců obsahují unikátní MTOCs, který je složený z pericentriolárních proteinů, zahrnujících tubulin pro tvorbu mikrotubulů (Ma *et* Viveiros, 2014).

Celý tento proces je řízen řadou endogenních faktorů. Mezi faktory z vnějšího prostředí, které mají schopnost do regulace zasahovat, patří mnoho environmentálních polutantů, které zahrnují i látky schopné mimikovat sloučeniny tělu vlastní – endokrinní disruptory (Vandenberg *et al.*, 2012). Mnohé z nich jsou velmi perzistentní, jiné se naopak rychle rozkládají a mohou tak působit jen po omezenou dobu, ale v kritickém období vývoje. Zatím mechanismy účinků nejsou podrobně objasněny, proto nezřídka není možné rozhodnout mezi přímými a nepřímými vlivy, mezi primárním a sekundárním efektem expozice. Velmi obtížná je extrapolace výsledků získaných *in vitro* na účinky *in vivo*, a také zhodnocení výsledků experimentů na zvířatech a jejich vypovídající schopnost pro expozici člověka. Řada rozporů panuje při hodnocení vztahů dávky a účinku (Diamanti, 2009). Přesto znikla řada studií prokazujících, že BPA vykazuje již při velmi malých koncentracích, jaké se vyskytují i přirozeně v životním prostředí, negativní účinky na organismus (vom Saal *et* Welshons, 2016). Toto zjištění vede k velkým obavám i z hlediska rozšiřujícího se trendu nahrazovat BPA za BPS, u něhož účinky na organismus nejsou zcela objasněny (Lenie *et al.*, 2008).

V případě BPA byl zjištěn vliv především na dva důležité úseky oogeneze. Jedná se o počátek meiózy a dále o období dělení zárodečných buněk a tvorby folikulů. Jelikož i v pozdějším stádiu vývoje savčích embryí vystavených BPA dochází k narušení a selhání při určení roviny štěpení, cytokinezi a organizaci vřeténka vyvstává naléhavá potřeba tyto mechanismy podrobit detailnímu průzkumu i v případě BPS (Peretz *et al.*, 2014).

V našich experimentech jsme prokázali, že i velmi malé koncentrace BPS mohou mít za následek nepravidelné uspořádání meiotického vřeténka. Bohužel v současné době neexistují studie, zabývající se vlivem BPS na savčí oocyty, proto se nabízí možnost srovnání s již prozkoumaným BPA. Výsledkem experimentů v rámci této diplomové práce bylo zjištění negativního dopadu BPS během *in vitro* zrání prasečích oocytů. Efekty BPS na průběh meiotického buněčného cyklu byly hodnoceny v časovém intervalu *in vitro* kultivace oocytů 48 hodin, které odpovídají stádiu druhé meiotické metafáze. V experimentu byly použity koncentrace, které odpovídají a/nebo jsou dokonce řádově nižší než (široké spektrum koncentrací detekovaných u člověka) koncentrace BPS naměřené v krevním séru a moči u člověka (Liao *et Kannan*, 2012). Řada EDCs vykazuje tzv. low dose effect, tedy dosahují v nízkých dávkách jiných či paradoxně vyšších účinků než v dávkách vysokých (vom Saal *et Welshons*, 2016, Grasselli *et al.*, 2010, Vandenberg *et al.*, 2012). Z toho důvodu byly zařazeny v experimentu i výrazně nízké koncentrace BPS (3nM, 300nM a 30 μM), aby bylo možné ověřit endokrinně disruptivní účinek BPS. Účinek BPS na utváření vřetene byl prokázán i v přítomnosti extrémně nízké dávky BPS 3nM. Ve stádiu druhé meiotické metafáze se objevily ve všech koncentracích zmenšené metafázní figury a paprskovité uspořádání mikrotubulů kolem metafázní figury. Popsané defekty mohou vysvětlovat změny, které byly prokázány v průběhu meiotického zrání v přítomnosti BPS. Mimo jiné se zde nabízí možná souvislost s aktivitou MAPK, která stimuluje kondenzaci chromatinu a kontroluje organizaci vřeténka (Sun *et al.*, 2002).

Abnormality v uspořádání meiotického vřetene po vystavení působení BPA byly již prokázány v mnoha studiích provedených u zvířat i lidí. Hunt *et al.*, 2003 našel u myších oocytů korelaci expozice BPA a selhání chromozomálního uspořádání. Navazující studie účinků BPA na myších oocytech potvrdily dopad BPA na utváření meiotického vřetene (Can *et al.*, 2005, Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2008). Na základě získaných poznatků ze studií na myších byly účinky BPA na konečnou fázi zrání oocytů *in vitro* zkoumány na lidských oocytech. Po expozici BPA nebyla část oocytů opět schopná dokončit meiózu. Dále byl zaznamenán zvýšení výskyt poruch během řazení chromozómů do ekvatoriální roviny, zvýšení počet aneuploidie a změny methylace DNA (Machtinger *et al.*, 2014).

Zásah BPA do progresu buněčného cyklu, architektury vřetena a organizaci chromozómů byl zjištěn i v průběhu zrání prasečích oocytů (Wang, 2016). Ani námi prokázaná četnost abnormalit nebyla lineárně závislá na zvyšující se dávce BPS. Toto tvrzení je v souladu s pozorováním myších oocytů vystavených koncentracím BPS během meiotického zrání (Pacchierotti *et al.*, 2008), kde byly ve shodě s naší studií prokázány změny

meiotického vřetene. Další změny vzniklé pod vlivem nízkých koncentrací BPA, byly prokázány u myších oocytů v MII, kdy docházelo k abnormalitám dělicího vřetene a nesprávnému uspořádání chromozómů. V experimentu byl zjištěn největší výskyt chaoticky uspořádaných chromozómů již při koncentraci 3nM BPA (Lenie *et al.*, 2008). Vyšší koncentrace BPA způsobují častější zastavení buněčného cyklu v MI. Hodges *et al.* (2002) ve své práci uvádí, že oocyty vystavené vysokým koncentracím BPA vykazovaly méně chybných metafázních figur, což může značit, že oocyty kultivované z preantrálních folikulů exprimují neporušený a funkční vřeténka během meiózy I. Zdá se tedy, že vážnost poškození dělicího vřetene souvisí s dávkou BPA.

To odpovídá i výsledkům našich experimentů, kde jsme prokázali, že BPS způsobuje poruchy uspořádání dělicího vřeténka během meiotického dělení. V našich pokusech dokonce i při nízkých koncentracích jako je 3nM BPS dochází k narušení tvorby vřetene, které způsobuje nepravidelnosti v uspořádání tubulinových vláken. Dochází například k poškození vláken dělicího vřeténka a dědičná informace není rozdělena rovnoměrně. Z takového uspořádání nemůže vzniknout životaschopné embryo. Jednotlivé defekty meiotického vřetene nejsou lineárně závislé na dávce BPS.

Zránění oocytu představuje klíčovou událost pro segregaci chromozómů a redukci množství DNA vyděleného pólového tělíska. Endokrinní disruptory, jako je BPA, jsou schopny narušit tyto procesy a tím výrazně ovlivnit reprodukční schopnosti (Machtinger *et al.*, 2014). Sledování cytoskeletálních změn umožňuje prokázat vliv BPS na zránění oocytů. Nicméně negativní vliv BPS na poruchy zránění oocytů zůstávají nepopsané.

V naší studii se podařilo poprvé prokázat, že BPS má na cytoskeletální struktury nejméně stejně nebezpečný dopad jako bylo potvrzeno v uvedených studiích týkajících se BPA.

7 Závěr

Výsledky poukázaly na vliv endokrinních disruptorů na utváření cytoskeletu oocytů. Vzhledem k blízké podobnosti prasečího a humánního modelu u meiotického zrání oocytu se nabízí možnost využít tyto poznatky pro zvýšení úspěšnosti v oblasti reprodukčních biotechnologií zvířat a lidí, kde je vznik oplození schopného oocytu předpoklad pro správný vývoj nového jedince.

Výsledky naší studie prokázaly, že BPS přináší ve srovnání s prozkoumaným BPA stejně nebezpečné účinky a tudíž nepředstavuje bezpečnější alternativu. Výsledky předkládané diplomové práce poukazují na potřebu dalších studií, které by napomohly objasnit celý proces meiotického zrání oocytu a zmapovat široké spektrum účinků a mechanismů BPS.

8 Seznam použité literatury

- ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. 2005. *Základy buněčné biologie*. 2. vyd. Espero Publishing. Ústí nad Labem. 740. ISBN: 80-902906-2-0.
- ALLARD, P., COLAIACOVO, M. P. 2010. Bisphenol A impairs the double-strand break repair machinery in the germline and causes chromosome abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107. 20405–20410.
- ALM, H., GREISING, T., BRÜSSOW, K. P., TORNER, H., TIEMANN, U. 2002. The influence of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenol on in vitro maturation of pig oocytes and in vitro culture of pig zygotes. *Toxicology In Vitro*. 16. 643–648.
- ANDREA, C. G. 2008. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 29 (3). 358–374.
- BEN-JONATHAN, N., STEIMETZ, R. 1998. Xenoestrogens: the emerging story of bisphenol A. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 9. 124–128.
- BIELANSKA-OSUCHOWSKA, Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive biology*. 6 (2). 161–193.
- BLACK, J. L., ERICKSON, B. H. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Record*. 161 (1). 45–56.
- BROMER, J. G., ZHOU, Y., TAYLOR, M. B., DOHERTY, L., TAYLOR, H. S. 2010. Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *The FASEB Journal*. 24. 2273–2280.
- BRONTONS, J. A., OLEA-SERRANO, M. F., VILLALOBOS, M., PEDRAZA V., OLEA, N. 1995. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect*. 103. 608-612.

CABATON, N. J., WADIA, P. R., RUBIN, B. S., ZALKO, D., SCHAEBERLE, C. M., ASKENASE, M. H., GADBOIS, J. L., THARP, A. P., WHITT, G. S., SONNENSCHNEIN, C., SOTO, A. M. 2011. Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environmental Health Perspectives*. 119. 547–552.

CAN, A., SEMIZ, O., CINAR, O. 2005. Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. *Mol Hum Reprod*. 11. 389–396.

CONTI, M., ANDERSEN, C. B., RICHARD, F. J., SHITSUKAWA, K., TSAFRIRI, A. 1998. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145. 9-14.

COTICCHIO, G., ALBERTINI, D. F., DE SANTIS, L. 2013. *Oogenesis*. Springer-Verlag. London. 364. ISBN: 978-0-85729-825-6.

DEKANT W., VÖLKEL, W. 2008. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol* 228. 114–134.

DEKEL N, LEWYSOHN O, AYALON D, HAZUM E. 1988. Receptors for gonadotropin releasing hormone are present in rat oocytes. *Endocrinology*. 123 (2). 1205-7.

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. *Endocr Rev*. 30 (4). 293-342.

EGGAN, K., JURGA, S., GOSDEN, R., MIN, I. M., WAGERS, A. J. 2006. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*. 441 (7097). 1109–1114.

EICHENLAUB-RITTER, U. AND PACCHIEROTTI, F. 2015. Bisphenol A Effects on Mammalian Oogenesis and Epigenetic Integrity of Oocytes: A Case Study Exploring Risks of Endocrine Disrupting Chemicals. *Biomed research international*. 698795. ISSN: 2314-6133.

EICHENLAUB-RITTER, U., VOGT, E., CUKURCAM, S., SUN, F., PACCHIEROTTI, F., PARRY, J. 2008. Exposure of mouse oocytes to bisphenol A causes meiotic arrest but not aneuploidy. *Mutation Research*. 651. 82–92.

ENGLAND, G. VON HEIMENDAHL, A. 2010. Determining Breeding Status. In: England, G. von Heimendahl, A. 2010. *Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology*. 2nd ed. BSAVA. 240. ISBN: 9787905319190

EPPIG, J. J. 1982. The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation and cumulus expansion. *Developmental Biology*. 89. 268–272.

ERICKSON, G. F. 2008. Follicle growth and development. *The global library of women's Mediciny*. ISSN: 1756-2228. Dostupný také z:
< http://www.glowm.com/section_view/item/288/recordset/18975/value/288>

FAIR, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*. 78. 203-216.

FAN, H. Y., Sun, Q. Y. 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*. 70 (3). 535–547.

FENICHEL, P., CHEVALIER, N., BRUCKER-DAVIS, F. 2013. Bisphenol A: an endocrine and metabolic disruptor. *Annales d'Endocrinologie*. Paris. 74. 211-220.

FERREIRA, E. M., VIREQUE, A. A., ADONA, P. R., MEIRELLES, F. V., FERRIANI, R. A., NAVARRO, P.A. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 15. 71 (5). 836–48.

FIC, A., ZEGURA, B., SOLLNER DOLENC, M., FILIPIC, M., PETERLIN MASIC, L. 2013. Mutagenicity and DNA damage of bisphenol A and its structural analogues in HepG2 cells. *Arh Hig Rada Toksikol*. 64. 189-200.

FULKA J., FIRST N. L., MOOR R. M. 1998: Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Molecular Human Reproduction*. 4 (1). 41–49.

FURST, P. 2006. Dioxins, polychlorinated biphenyls and other organohalogen compounds in human milk - Levels, correlations, trends and exposure through breastfeeding. *Molecular Nutrition & Food Research*. 50 (10). 922-933.

GANONG, W. F. 2005. *Přehled lékařské fyziologie*, dvacáté vydání. Galén. 890. ISBN: 8072623117.

GEORGE, O., BRYANT, BJ. K., CHINNASAMY, R., CORONA, C., ARTERBURN, J. B., SHUSTER, CH. B. 2008. Bisphenol a directly targets tubulin to disrupt spindle organization in embryonic and somatic cells. *Acs chemical biology*. 3 (3). 167-179.

GILBERT, S. F. 2000. *Developmental Biology*. 6th ed. Sinauer Associates. Sunderland. 695. ISBN: 978-0878932436.

GLAUSIUSZ, J. 2014. Toxicology: The plastics puzzle. *Nature*. 508. 306–308.

GOLDEN, R. J., NOLLER, K. L., TITUS, E. L., KAUFMAN, R. H., MITTENDORF, R., STILLMAN, R., REESE, E. A. 1998. *Critical Reviews in Toxicology*. 28. 109–127.

- GRASSELLI, F., BARATTA, L., BAIONI, L., BUSSOLATI, S., RAMONI, R., GROLI, S., BASINI, G. 2010. Bisphenol A disrupts granulosa cell function. *Domestic Animal Endocrinology*. 39. 34–39.
- GRIFFITH, O. W., STUEHR, D. J. 1995. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annual review of physiology*. 57. 707–736.
- HEIMEIER, R. A., SHI, Y. B. 2010. Amphibian metamorphosis as a model for studying both the morphological effects and the underlying molecular basis of endocrine disruptors on vertebrate development: A case study with the xenoestrogen bisphenol A. *General and Comparative Endocrinology*. 168. 181–189.
- HIRSHFIELD, A. N. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*. 124. 43–101.
- HITES, R. A., FORAN, J. A., SCHWAGER, S. J., KNUTH, B. A., HAMILTON, M. C., CARPENTER, D. O. 2004. Global assessment of polybrominated diphenyl ethers in farmed and wild salmon. *Environmental Science & Technology*. 38 (19). 4945-4949.
- HODGES, C. A., ILAGAN, A., JENNINGS, D., KERI, R., NILSON, J., HUNT, P. A. 2002. Experimental evidence that changes in oocyte growth influence meiotic chromosome segregation. *Human Reproduction*. 17. 1171–1180.
- HOSSNER, K. L. 2005. Hormonal regulation of farm animal growth. Cabi publishing. Colorado. 231. ISBN: 9781845930905.
- HUBBARD C. J., TERRANOVA P. F. 1982. Inhibitory action of cyclic guanosine 50-phosphoric acid (GMP) on oocyte maturation: dependence on an intact cumulus. *Biology of Reproduction*. 26. 628–32.
- HUNT, P. A., KOEHLER, K. E., SUSIARJO, M., HODGES, C. A., ILAGAN, A., VOIGT, R. C., THOMAS, S., THOMAS, B. F., HASSOLD, T. J. 2003. Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Current Biology*. 13. 546–553.

HUNTER, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5. 122–130.

HURK, R., ZHAO, J. 2004. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 2005 (63). 1717–1751.

CHAO, H. H., ZHANG, X. F., CHEN, B., PAN, B., ZHANG, L. J., LI, L., SUN X. F., SHI, Q. H., SHEN, W. 2012. Bisphenol A exposure modifies methylation of imprinted genes in mouse oocytes via the estrogen receptor signaling pathway. *Histochemistry cell biology* 2. 249–259.

CHEON, Y. 2012. Regulation and 3 dimensional culture of tertiary follicle growth. *Clinical Experimental Reproductive Medicine*. 39 (3). 95-106.

CHOI, B., HARVEY, A. J., GREEN, M. P. 2016. Bisphenol A affects early bovine embryo development and metabolism that is negated by an oestrogen receptor inhibitor. *Scientific Reports*. 6. 29318.

JI, K., HONG, S., KHO, Y., CHOI, K. 2013. Effects of bisphenol s exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environ Sci Technol*. 47. 8793-8800.

JIN, F. R., ZHAO, Z. S. 1997. The production and application of the diphenol sulfone. *Hua. Gong. Shi. Kan*. 11. 21.

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.

JOHNSON, J., CANNING, J., KANEKO, T., PRU J. K., TILLY, J. L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428. 145–150.

JOHNSON, S. A., JAVUREK, A. B., PAINTER, M. S., PERITORE, M. P., ELLERSIECK, M. R., ROBERTS, R. M., ROSENFELD, C. S. 2015. Disruption of Parenting Behaviors in California Mice, a Monogamous Rodent Species, by Endocrine Disrupting Chemicals. PLoS ONE. 10. 10.1371.

KIKUCHI, K., IZAIKE, Y., NOGUCHI, J., FURUKAWA, T., DAEN, T., NAITO, F. P., TOYODA, K. 1995. Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged *in vitro*. Journal of Reproduction and Fertility. 105. 325-330.

KOSAKO, H., GOTOH, Y., NISHIDA, E. 1994. Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. The EMBO Journal. 13. 2131–2138.

KRISHER R. L. 2004. The effect of oocyte quality on development. Journal of Animal Science. 82. 14–23.

KUDLÁČ, E., ELEČKO, J. 1987. Veterinární porodnictví a gynekologie. SZN. Praha. 576.

KRUGER, T., LONG, M., BONEFELD-JORGENSEN, E. C. 2008. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. Toxicology. 246. 112–123.

KŘESINOVÁ, Z., SVOBODOVÁ, K., CAJTHAML, T. 2009. Mikrobiální degradace endokrinně disruptivních látek. Chemické Listy. 103. 200-207.

KUIPER, G. G., SHUGHRUE P. J., MERCHENTHALER, I., GUSTAFSSON J. A. 1998. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. Front Neuroendocrinol. 19. 253–286.

KUJALOVÁ, H., SÝKORA, V., PITTER, P. 2007. Látky s estrogením účinkem ve vodách. Chemické Listy. 101. 706-712.

LANDIM-ALVARENGA, F. C., MAZIERO, R. R. D. 2014. Control of oocyte maturation. Animal Reproduction. 11 (3). 150–158.

- LENIE, S., CORTVRINDT, R., EICHENLAUB-RITTER, U., SMITZ, J. 2008. Continuous exposure to bisphenol A during in vitro follicular development induces meiotic abnormalities. *Mutation Research*. 651. 71-81.
- LEMEIRE, K., VAN MERRIS, V., CORTVRINDT, R. 2007. The antibiotic streptomycin assessed in a battery of in vitro tests for reproductive toxicology. *Toxicology In Vitro*. 21. 1348–1353.
- LI, D. J. K., ZHOU, Z., MIAO, M., HE, Y., WANG, J., FERBER, J. 2011. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertility and Sterility*. 95. 625–630.
- LIANG, CH., SU, Y., FAN, H., SCHATTEN, H., SUN, Q. 2007. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Molecular endocrinology*. 21 (9). 2037–2055.
- LIAO, C., KANNAN, K. 2011. Widespread occurrence of bisphenol A in paper and paper products: implications for human exposure. *Environmental Science and Technology*. 45. 9372–9379.
- LIAO, C., KANNAN, K. 2012. Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Environmental science & technology*. 46 (9). 5003-5009.
- LIAO, C., LIU, F., ALOMIRAH, H., LOI, V. D., MOHD, M. A., MOON, H.B., NAKATA, H., KANNAN, K. 2012. Bisphenol S in Urine from the United States and Seven Asian Countries: Occurrence and Human Exposures. *Environmental Science & Technology*. 46 (12). 6860- 6866.
- LONERGAN, P., MONAGHAN, P., RIZOS, D., BOLAND, M. P. AND GORDON, I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev*. 37. 48–53.

MA, W., VIVEIROS, M. M. 2014. Depletion of Pericentrin in Mouse Oocytes Disrupts Microtubule Organizing Center Function and Meiotic Spindle Organization. *Molecular Reproduction & Development*. 81 (11). 1019 - 1029.

MACHTINGER, R., ORVIETO, R. 2014. Bisphenol A, oocyte maturation, implantation, and IVF outcome: review of animal and human data. *Reproductive Biomedicine Online*. 29. 404–410.

MARKEY, C. M., WADIA, P. R., RUBIN, B. S., SONNENSCHNEIN, C., SOTO, A. M., MELZER, D. 2005. Long-Term Effects of Fetal Exposure to Low Doses of the Xenoestrogen Bisphenol-A in the Female Mouse Genital Tract. *Biology of Reproduction*. 72. 1344–1351.

MARKSTRÖM, E., SVENSSON, E. C. H., SHAO, R., SVANBERG, B., BILLIG, H. 2002. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. *Reproduction*. 123. 23–30.

MARTEIL, G., RICHARD-PARPAILLON, L., KUBIAK, J. Z. 2009. Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reproductive Biology*. 9. 203-224.

MASUI, Y., MARKERT, C. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of experimental zoology*. 177. 129–146.

MATHEW, M., SREEDHANYA, S. N., MANOJ, P., ARAVINDAKUMAR, CH. T., ARAVIND, U. K. 2014. Exploring the Interaction of Bisphenol-S with Serum Albumins: A Better or Worse Alternative for Bisphenol-A? *The Journal Physical Chemistry B*. 118. 3832–3843.

MEHLMANN, L. M. 2005. Stops and starts in mammalian oocyte: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*. 130 (6). 791–799.

MEINECKE, B., JANAS, U., PODHAJSKY, E., MEINECKE-TILLMANN, S. 2001. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. *Reprod Dom Anim*. 36. 183 - 188.

- MERMILLOD, P., DALBIÈS-TRAN, R., UZBEKOVA, S., THÉLIE, A., TRAVERSO, J., PERREAU, C., PAPILLIER, P. AND MONGET, P. 2008. Factors Affecting Oocyte Quality: Who is Driving the Follicle? *Reproduction in Domestic Animals*. 43. 393–400.
- MERMILLOD, P., OUSSAID, B. AND COGNIÉ, Y. 1999. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54. 449–460.
- MORBECK, D. E., ESBENSHADE, K. L., FLOWERS, W. L., BRITT, J. H. 1992. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biology of Reproduction*. 47. 485-491.
- MORRISSEY, R. E., GEORGE, J. D., PRICE, C. J., TYL, R. W., MARR, M. C., KIMMEL, C. A. 1987. *Fundam. Appl. Toxicol.* 8. 571–582.
- MOTLÍK, J., CROZET, N., FULKA, J. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Reviews of Reproduction*. 72 (1). 323 – 328.
- NADERI, M., WONG, M. Y. L., GHOLAMI, F. 2014. Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-Simpairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquatic Toxicology*. 148. 195-203.
- NAITO, K. AND TOYODA, Y. 1991. Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in pig oocytes *Journal of Reproduction and Fertility*. 93. 467–473.
- 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.

OEHLMANN, J., SCHULTE-OEHLMANN, U., KLOAS, W., JAGNYTSCH, O., LUTZ, I., KUSK, K. O., WOLLENBERGER, L., SANTOS, E. M., PAULL, G. C., VAN LOOK, K. J. W., TYLER, CH. R. 2009. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife, *Philosophical transactions of the royal society B-biological sciences*. 1526. 2047-2062.

PACCHIEROTTI, F., RANALDI, R., EICHENLAUB-RITTER, U., ATTIA, S., ADLER, I. D. 2008. Evaluation of aneugenic effects of bisphenol A in somatic and germ cells of the mouse. *Mutation Research*. 651. 64–70.

PAULINI, F., SILVA, R. C., DE PAULA ROLO, J. L. J., LUCCI, C. M. 2014. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *Journal of Ovarian Research*. 7. 102.

PATISAUEL, H. B., FORTINO, A. E., POLSTON, E. K. 2006. Neonatal genistein or bisphenol-A exposure alters sexual differentiation of the AVPV. *Neurotoxicology and Teratology*. 28. 111–118.

PENNIE, W. D., ALDRIDGE T. C., BROOKS A. N. 1998. Differential activation by xenoestrogens of ER alpha and ER beta when linked to different response elements. *Journal of Endocrinology*. 158. 11– 14.

PERETZ, J., VROOMAN, L., RICKE, W. 2014. Bisphenol A and Reproductive Health: Update of Experimental and Human Evidence, 2007-2013. *Environmental Health Perspectives*. 122 (8). 775-786. ISSN: 0091-6765.

PETR, J., ROZINEK, J., HRUBAN, V., JÍLEK, F., SEDMÍKOVÁ, M., VAŇOURKOVÁ, Z., NĚMEČEK, Z. 2001. Ultrastructural localization of calcium deposits during in vitro culture of pig oocytes. *Molecular reproduction and development*. 58. 196-204.

QIU, W., ZHAO, Y., YANG, M., FARAJZADEH, M., PAN, CH., WAYNE, N. L. 2015. Actions of Bisphenol A and Bisphenol S on the Reproductive Neuroendocrine System During Early Development in Zebrafish. *The Endocrine Society*. 157 (2). 636-647.

RAMOS, J. G., VARAYOUD, J., KASS, L., RODRÍGUEZ, H., COSTABEL, L., MUÑOZDE-TORO, M., LUQUE, E. H. 2003. Bisphenol A induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitarygonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology*. 144. 3206– 3215.

RATNER, A. 1976. Effects of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone upon cyclic AMP and cyclic GMP levels in rat ovaries in vitro. *Endocrinology*. 99. 1496–1500.

ROCHESTER, J. R., BOLDEN, A. L. 2015. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ Health Perspect* 123. 643–650.

ROGAN, W. J., RAGAN, N. B. 2003. Evidence of effects of environmental chemicals on the endocrine system in children. *Pediatrics*. 112 (1). 247-252.

RUBIN, B. S. 2011. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 127(1-2). 27-34.

SADLER, T. W. 2011. *Langmanova lékařská embryologie*. Grada Publishing. Baltimore. 414. ISBN: 978-80-247-2640-3.

SÁNCHEZ, F., SMITZ, J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1822. 1896-1912.

SENBON, S., HIRAO, Y., MIYANO, T. 2003. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. *Journal of Reproduction and Development*. 49. 259-269.

SCHRAMM, R. D., BAVISTER, B. D. 1999. Onset of nucleolar and extranucleolar transcription and expression of fibrillarin in mouse embryos developing in vitro. *Biology of Reproduction*. 60. 721-728.

SLÁDEČEK, F. 1986. *Rozmnožování a vývoj živočichů: základy vývojové biologie*. 2. vyd. Academia. Praha. 487. ISBN: 21 088 86.

SONGSASEN, N., WILDT, D. E. 2007. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Animal Reproduction Science*. 98 (1-2). 2-22.

STOJKOVIC M., MOTLÍK J., KÖLLE S. ZAKHARTCHENKO V., ALBERIO R., SINOWATZ F., WOLF E. 1999. *Reproduction of domestic animals*. 34. 335-342.

SUN, Q. Y., LAI, L., PARK, K. W., KUHHLZER, B., PRATHER, R. S., SCHATTEN, H. 2001. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*. 64. 871–889.

SUN, Q. Y., NAGAI, T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development*. 45 (5). 347-359.

SUN, Q. Y., WU, G. M., LAI, L., BONK, A., CABOT, R., PARK, K. W., DAY, B. N., PRATHER, R. S., SCHATTEN, H. 2002. Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation, microtubule organization, chromatin behavior, and cell cycle progression by protein phosphatases during pig oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*. 66. 580–588.

TAKAI, Y., TSUTSUMI, O., IKEZUKI, Y., HIROI, H., OSUGA, Y., MOMOEDA, M., YANO, T., TAKETANI, Y. 2000. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 21. 918–921.

TIAN, X. C., LONERGAN, P. JEONG, B., S. EVANS, A. C., YANG, X. 2002. Association of MPF, MAPK, and nuclear progression dynamics during activation of young and aged bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 62 (1). 132–138.

TONG, C., FAN, H. Y., CHEN, D. Y., SONG, X. F., SCHATTEN, H., SUN, Q. Y. 2003. Effects of MEK inhibitor U0126 on meiotic progression in mouse oocyte: microtubule organization, asymmetric division and metaphase II arrest. *Cell Research*. 13. p. 375–385.

TORNELL J., BILLIG H., HILLENSTJO T. 1990. Resumption of rat oocyte meiosis is paralleled by a decrease in guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cGMP) and is inhibited by microinjection of cGMP. *Acta Physiologica Scandinavica*. 139. 511–517.

TOSTI, E. 2006. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4 (26). 1–26.

TOSTI, E., BONI, R., GALLO, A., SILVESTRE, F. 2013. Ion currents modulating oocyte maturation in animals. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 59 (2). 61–68.

TŮMOVÁ, L., CHMELÍKOVÁ, E., ŽALMANOVÁ, T., KUČEROVÁ-CHRPOVÁ, V., ROMAR, R., DVOŘÁKOVÁ, M., HOŠKOVÁ, K., PETR, J. 2016. Calcineurin role in porcine oocyte activation. *Animal*. 10 (12). 1998-2007.

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

VACCARI, S., WEEKS, J. L., HSIEH, M., MENNITI, F. S., CONTI, M. 2009. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of Reproduction*. 81 (3). 595-604.

VANDENBERG, L. N., COLBORN, T., HAYES, T. B., HEINDEL, J. J., JACOBS JR., D. R., LEE D. H., SHIODA, T., SOTO, A. M., VOM SAAL, F.S., WELSHONS, W.V., ZOELLER, R T., MYERS J. P. 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews*. 33. 378–455.

VANDENBERG, L. N., MAFFINI, M. V., WADIA, P. R., SONNENSCHNEIN, 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., CHAHOUD, I., HEINDEL, J. J., PADMANABHAN, V., PAUMGARTTEN, F. J. R., SCHOENFELDER, G. 2010. Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*. 118 (8). 1055-1070.

VANDERHYDEN, B. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience*. 7 (1). 2006–2022.

VEIGA-LOPEZ, A., LUENSE, L. J., CHRISTENSON, L. K., PADMANABHAN, V. 2013. Developmental programming: gestational bisphenol-A treatment alters trajectory of fetal ovarian gene expression. *Endocrinology*. 154 (5). 1873–1884.

VERLHAC, M. H., KUBIAK, J. Z., CLARKE, H. J., MARO, B. 1994. Microtubule and chromatin behaviour follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*. 120. 1017–1025.

VOGEL, S. A. 2009. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a “safety”. *Am. J. Public Health*. 99 (3). 559-566.

VOM SAAL, F. S., WELSHONS, W. V. 2016. Endocrine disruptors: Manmade and natural oestrogens: opposite effects on assisted reproduction. *Nature Reviews Endocrinology* . 12. 251–252.

WANG, T., HAN, J., DUAN, X., XIONG, B., CUI, X. S., KIM, N. H., LIU, H. L., SUN, S. CH. 2016. The toxic effects and possible mechanisms of Bisphenol A on oocyte maturation of porcine in vitro. *Oncotarget*. 7. 32554-32565.

WATSON, C. S., BULAYEVA, N. N., WOZNIAK, A. L., FINNERTY, C. C. 2005. Signaling from the membrane via membrane estrogen receptor-alpha: estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens. *Steroids*. 70. 364–371.

WATSON, CHERYL S., YOW-JIUN JENG, A., MIKHAIL Y. KOCHUKOV. 2008. „Nongenomic actions of estradiol compared with estrone and estriol in pituitary tumor cell signaling and proliferation". *The FASEB Journal*. 22 (9): 3328–36.

WASSARMAN, P. M. 1988. The Mammalian ovum. In: KNOBIL, E., NEIL, J. (eds.). 1988. The Physiology of Reproduction. Raven Press. New York. 69–102.

WASSARMAN, P., ALBERTINI, D. F. 1994. The Mammalian Ovum, Second Edition. The Physiology of Reproduction. Raven Press. New York. 79-122.

WHITE, Y. A., WOODS, D. C., TAKAI, Y., ISHIHARA, O., SEKI, H., TILLY, J. L. 2012. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nature medicine*. 18 (3). 413–421.

YANG, Y. J., HONG, Y. C., OH, S. Y., PARK, M. S., KIM, H., LEEM, J. H., HA, E. H. 2009. Bisphenol A exposure is associated with oxidative stress and inflammation in postmenopausal women. *Environmental Research*. 109. 797–801.

YANAGIMACHI, R. 1988. Mammalian fertilization. In: Knobil E., Neill J. (eds.): The Physiology of Reproduction. Raven Press. New York. 135–185.

ZALCO, D., JACQUES, C., DUPLAN, H., BRUEL, S., PERDU, E. 2011. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere*. 82. 424–430.

ZHANG, X., KHIMJI, I., SHAO, L., SAFAEE, H., DESAI, K., KELES, H. O., DEMIRCI, U. 2012. Nanoliter droplet vitrification for oocyte cryopreservation. *Nanomedicine*. 7. (4). 553–564.

ZIMMERMAN, J. B., ANASTAS, P. T. 2015. Toward substitution with no regrets. *Science*. 347. 1198–1199.

ŽALMANOVÁ, T., HOŠKOVÁ, K., NEVORAL, J., PROKEŠOVÁ, Š., ZÁMOSTNÁ, J., KOTT, T., PETR, J. 2016. Bisphenol S instead of bisphenol A: a story of reproductive disruption by regrettable substitution - a review. *Czech Journal of Animal Sciences*. 61. 433–449.