

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Reprodukční a vývojová biologie



Bc. Bára Procházková

Vliv pergafastu 201 na vybrané markery meiotického zrání prasečích oocytů *in vitro*
Effect of pergafast 201 on selected markers of *in vitro* maturation of porcine oocytes

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Jaroslav Petr, DrSc.

Praha, 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně, také že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného ani stejného akademického titulu.

V Praze, dne 3. ledna 2023

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomáhali při vzniku této diplomové práce. Děkuji svému vedoucímu panu prof. Ing. Jaroslavu Petrovi, DrSc., za jeho cenné rady, nadšení a ochotu, se kterou předává své zkušenosti dál. Dále bych ráda poděkovala Ing. Tereze Žalmanové, Ph.D., a Ing. Šárce Prokešové, Ph.D., za jejich vstřícný přístup, laskavost a především čas, který mi věnovaly. Také bych ráda poděkovala Bc. Martinu Nejedlymu Dankovi, MSc, za pomoc se statistickou stránkou práce a jeho nekonečnou podporu. Velké díky patří i Mgr. Magdaleně Zachové za jazykovou korekturu práce. Na závěr bych ráda poděkovala své rodině za podporu během celého studia, jmenovitě svému snoubenci a našemu kocourovi Červánkovi.

Abstrakt

Pergafast 201 (N-(p-Toluenesulfonyl)-N'-(3-p-toluenesulfonyloxyphenyl)urea) je patentovaná vývojka barvy, která se nabízí jako alternativa k hojně využívaným bisfenolům A a S (BPA, BPS). U těchto látek byl prokázán negativní vliv na lidské zdraví a reprodukci již ve velmi nízkých dávkách a jedná se o endokrinní disruptory zasahující mimo jiné do procesu meiotického zrání. Účinky pergafastu 201 na savčí organismus v rámci oogeneze zatím nebyly sledovány. Cílem této práce bylo zhodnocení vlivu pergafastu 201 na vybrané specifické markery meiotického zrání po expozici prasečích oocytů pergafastem 201 v nízkých koncentracích *in vitro*.

Tato práce je první, která popisuje negativní účinky pergafastu 201 na zrání prasečích oocytů *in vitro*, potvrzuje negativní vliv pergafastu na průběh meiotického zrání a na schopnost oocytu dosáhnout konečného stádia zrání a také jeho vliv na zvýšenou incidenci abnormálních dělicích vřetének. Data ukazují vliv PF201 na metylaci epigenetických markerů H3K4me2 a H3K9me3. Předběžné výsledky také naznačují jeho vliv na expresi mRNA estrogenových receptorů α a β . Souhrnně tyto výsledky ukazují na případná rizika spojená s používáním této látky jako alternativy bisfenolů a nutnost prozkoumání jeho vlivu nejen na reprodukční zdraví lidí a zvířat.

Abstract

Pergafast 201 (N-(p-Toluenesulfonyl)-N'-(3-p-toluenesulfonyloxyphenyl)urea) is a patented color developer that is offered as an alternative to the widely used bisphenols A and S (BPA, BPS). These substances have been shown to have a negative effect on human health and reproduction even in very low doses, and they are endocrine disruptors affecting, among other things, the process of meiotic maturation. The effects of pergafast 201 on the mammalian organism during oogenesis have not yet been monitored. The aim of this work was to evaluate the effect of pergafast 201 on selected specific markers of meiotic maturation after exposure of porcine oocytes to pergafast 201 in low concentrations *in vitro*.

This work is the first to describe the negative effects of pergafast 201 on the maturation of porcine oocytes *in vitro*, confirming the negative effect of pergafast on the course of meiotic maturation and on the ability of the oocyte to reach the final stage of maturation, as well as its effect on the increased incidence of abnormal dividing spindles. The data show the effect of PF201 on the methylation of epigenetic markers H3K4me2 and H3K9me3. Preliminary results also indicate its effect on the mRNA expression of estrogen receptors α and β . Collectively, these results indicate the possible risks associated with the use of this substance as an alternative to bisphenols and the necessity of investigating its effect on not only the reproductive health of humans and animals.

Obsah

Úvod.....	1
1. Oogeneze	2
1.1 Proliferace a migrace primordiálních zárodečných buněk	2
1.2 Růst oocyty	4
1.3 Meiotická kompetence	5
1.4 Meiotické zrání	6
1.5 Folikulogeneze	12
2. Faktory ovlivňující oogenezi	13
2.1 MPF (M-phase promoting factor)	13
2.2 MAP kináza (mitogen-activated protein kinase)	14
2.3 CSF (cytostatický faktor)	15
2.4 Cyklické nukleotidy	16
2.5 Vápník	17
2.6 Steroidní hormony	18
3. Reprodukčně toxické látky	20
4. Pergafast 201	24
5. Hypotéza a cíle práce	26
6. Materiály a metodika	27
7. Výsledky	32
7.1 Vliv PF201 na průběh meiotického zrání	32
7.2 Vliv PF201 na utváření dělicího vřeténka v průběhu meiotického zrání	33
7.3 Vliv PF201 na změnu v metylaci histonů H3K4me2 a H3K9me3	35
7.4 Vliv PF201 na expresi mRNA EsR α a EsR β v oocytech během meiotického zrání	39
8. Diskuze	41
9. Závěr	48
10. Citovaná literatura	49

Seznam zkratek

AC - adenylylcykláza

APC/C - Komplex podporující anafázi

ATP - adenosintrifosfát

Blimp1 - B-lymphocyte-induced maturation protein 1

Bmp - Bone morphogenetic protein

BMP15 - Bone morphogenetic protein 15

BPA - bisfenol A

BPS - bisfenol S

CaMKII - kalmodulin-dependentní proteinkinázy II

cAMP - cyklický adenosinmonofosfát

Cdk1 - Cyklin dependentní kináza

cGMP - cyklický guanosinmonofosfát

COC - kumulo-oocytární komplex

CSF - cytostatický faktor

DAG - diacylglycerol

DDT - dichlordifenyltrichlorethan

DEHP - di-(2-ethylhexyl)ftalát

DIDP - diisodecylftalát

DINP - diisononylftalát

DNA - Deoxyribonukleová kyselina

E2 - estradiol

ED - endokrinní disruptor

Emi1 - early mitotic inhibitor 1

EPA - Agentura pro ochranu životního prostředí

ER - endoplazmatického retikula

ERK - extracelulárním signálem regulovaná kináza

EsR - estrogenový receptor

EsR α - estrogenový receptor α

EsR β - estrogenový receptor β
FSH - Folikulostimulační hormon
GA - Golgiho aparátu
GDF9 - Growth differentiation factor 9
GnRH - hormon uvolňující gonadotropin
GPR - receptor spojený s G-proteinem
GPR3 - receptor 3 spojený s G-proteinem
GV - germinal vesicle
GVBD -germinal vesicle breakdown
HCH - hexachlorocyclohexan
Ins(1,4,5)P3 - inositol-1,4,5-trifosfát
InsP3R - inositol-1,4,5-trifosfátový receptor
JNK - Jun amino-terminální kináza
KG - kortikální granula
konexin 37 - Cx 37
konexin 43 - Cx43
LH - luteinizační hormon
MAP kináza - mitogen-activated protein kinase
MI - meioza I
MPF - M-phase promoting factor
MTOC - Microtubule organizing center
NuMa - Nuclear Mitotic Apparatus
Oct4 - Octamer-binding transcription factor 4
p38/SAPK - stresem aktivovaná proteinkináza
PDE3A - cyklická nukleotidová fosfodiesteráza 3
PF201 - pergafast 201
PGCs - primordial germ cells
PI3K - fosfatidylinositol-3-kináza
PKA - protein kináza A
PLC - fosfolipáza C

Plx1 - Polo-like kináza

PPA2 - protein fosfatáza 2

PtdIns(4,5)P2 - fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát

ROS - reaktivní forma kyslíku

RSK - protein kináza p90rsk

RTK - receptorová tyrosinkináza

RYR - ryadonidový receptor

SAC - spindle assembly checkpoint

SDF1 - stromal-derived factor-1

TGF- β - transforming growth factor β

ZP - zona pellucida

γ -TuRC - γ -tubulin ring komplexu

Úvod

Některé z toxických chemikálií každoročně produkovaných ve velkém množství se mohou kumulovat v životním prostředí a jako environmentální polutanty mohou mít tyto látky nepříznivý vliv na reprodukční zdraví lidí a zvířat. K expozici člověka těmito látkami dochází cestou inhalace, orálně či transdermálně, a pro velkou část společnosti je tak nevyhnutelná. Do této skupiny látek patří mimo jiné endokrinní disruptory (ED) narušující fyziologické hormonální funkce organismu zvířat a lidí. Mezi nejznámější ED patří Bisfenol A (BPA), který je celosvětově vysoce produkovanou chemikálií využívanou jako monomer při výrobě plastů a jako vývojka barvy v termocitlivém papíru. Se vzrůstajícím počtem studií prokazujících jeho negativní vliv na reprodukční zdraví byla jeho produkce omezena a BPA byl postupně nahrazován alternativami, jako jsou Bisfenol S (BPS) a PF201. Řada studií již potvrdila negativní vliv BPS na fyziologii člověka, jeho produkce však v současné době nepodléhá žádným regulacím. Podle dostupných studií se také chová jako endokrinní disruptor napodobující hormon estradiol, a jedná se tak o „politováníhodnou náhradu“. Tyto chemikálie mohou migrovat na kůži z produktů denní potřeby, jako jsou např. účtenky, případně se vstřebávat a být metabolizovány.

Pergafast 201 (N-(p-Toluenesulfonyl)-N'-(3-p-toluenesulfonyloxyphenyl)urea je chemická látka nejčastěji se vyskytující po BPA a BPS na termocitlivém papíru. V současné době existuje pouze velmi omezené množství studií sledujících vliv pergafastu na endokrinní systém a jeho vliv na reprodukční zdraví je otázkou. Byla u něj potvrzena toxicita pro vodní organismy, persistence v životním prostředí a afinita k některým proteinům asociovaným s neinfekčními onemocněními. Naše data naznačují, že stejně jako v případě BPS by se po podrobnějším výzkumu u PF201 mohl potvrdit jeho negativní vliv na reprodukční zdraví. V této práci sledujeme vliv PF201 na důležité markery meiotického zrání prasečích oocytů a na celkový průběh zrání. Jako experimentální model bylo zvoleno prase pro svou fyziologickou podobnost s lidským organismem.

1. Oogeneze

Oogeneze je vývojový proces vedoucí k tvorbě vysoce specializované samičí pohlavní buňky – oocytu. Klíčovým dějem pro vznik oocytu je redukční dělení, tzv. meióza, při které během dvou následujících dělení dochází k redukci počtu chromozomů na polovinu, a zralý oocyt má tedy haploidní počet chromozomů oproti somatickým buňkám. Tento vývoj probíhá u člověka částečně již v prenatalním období, kdy dochází k migraci a množení primordiálních zárodečných buněk (primordial germ cells – PGCs), a pokračuje později v pubertě růstem a zráním oocytu až po ukončení oogeneze při dosažení menopauzy. Oogeneze probíhá ve třech fázích: proliferace, růst a zrání oocytu.

1.1 Proliferace a migrace primordiálních zárodečných buněk

Pohlavní buňky diferencují z PGCs, které vznikají z epiblastu v raných fázích vývoje embrya a poté migrují do genitálních lišt, kde se somatickými buňkami tvoří základ gonád. Tento proces je evolučně vysoce konzervovaný a dochází k němu jak u člověka, tak i u mnoha dalších druhů savců (Gardner, 1978; Wylie, 1993).

U myších embryí vznikají první prekurzory PGCs z buněk epiblastu nacházejících se v blízkosti extraembryonálního ektodermu (de Sousa Lopes et al., 2007; Wear et al., 2016). Tyto buňky se mitoticky dělí a větší populaci je poté možné detekovat v extraembryonálním mezodermu posteriorně k primitivnímu proužku. Odtud PGCs pomocí invaginace pasivně migrují do epitelu zadního střeva a následně pak migrují aktivně chemotaxí skrze dorzální mesenterium do levé a pravé genitální lišty, kde ztrácejí svoji schopnost motility (Clark & Eddy, 1975; Ginsburg et al., 1990).

U prasečích embryí se první PGCs objevují ve stejné oblasti jako u myši a následně i obdobně migrují do místa budoucích gonád, kde intenzivně proliferují (Kobayashi et al., 2017; Takagi et al., 1997). Po dosažení genitálních lišt dochází u PGCs k mitotickému dělení, epigenetickému reprogramování a reaktivaci inaktivovaného X-chromozomu (Hajkova et al., 2002; Tam et al., 1994). K epigenetickému reprogramování dochází rovněž u prasat, což naznačuje evoluční konzervovanost tohoto děje (Hyldig et al., 2011).

K udržení pluripotence a zabránění diferenciaci PGCs je nezbytná řada transkripčních faktorů, pro přežití jsou důležité antiapoptotické faktory (např. Oct4 – Octamer-binding

transcription factor 4) (Kehler et al., 2004) a pozitivní regulátory proliferace (např. cAMP – cyklický adenosinmonofosfát) (De Felici, 2000). Pro specifikaci prekursorů PGCs z buněk epiblastu je nezbytný protein Blimp1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1) a proteiny z rodiny Bmp (bone morphogenetic protein) a Smad (Lawson et al., 1999; Ohinata et al., 2005; Saitou, 2009). Jeden z důležitých faktorů je ligand tyrosin-kinázového receptoru c-kit ovlivňující migraci, proliferaci a přežití PGCs (Matsui et al., 1990; Runyan et al., 2006). Aktivní migraci do místa budoucích gonád zajišťují chemoaktiny (stromal-derived factor-1 (SDF1)), které se vážou na receptory PGCs a jsou produkované buňkami v genitálních lištách a okolními somatickými buňkami (Molyneaux et al., 2003).

Po ukončení migrace do místa budoucích gonád dochází u PGCs k mitotickému dělení jader bez kompletní cytokineze buněk a vznikají tak „germ cell nests“, tedy shluky buněk spojené cytoplazmatickými můstky obklopené somatickými buňkami (Gondos et al., 1971). V těchto shlucích poté jádra oogonií podstupují poslední replikaci DNA, vstupují do meiozy a stávají se primárními oocyty (Chuma & Nakatsuji, 2001). Primární oocyty procházejí v prenatalním období fázemi profáze I – leptotene, zygotene, pachytene a diplotene, ve které je meioza zastavena. V tomto tzv. prvním meiotickém bloku zůstává oocyt až do pohlavní zralosti, což může v závislosti na druhu trvat i desítky let. Ve fázi profáze dochází k homolognímu párování chromozomů a vzniku překřížení mezi nesesterskými chromatidami – crossing-overu. Paralelně se vstupem do meiozy se rozpadají cytoplazmatické můstky „germ cell nests“ a dochází k formaci primordiálního folikulu, který je morfologicky definovaný jako oocyt obklopený jednou vrstvou plochých granulozních buněk (Picton et al., 1998). V průběhu formace dochází k apoptóze až dvou třetin buněk, což pravděpodobně slouží k eliminaci nezdravých a neperspektivních buněk (Pepling & Spradling, 2001).

Zásoba primordiálních folikulů vytvořených v raném vývoji jedince má limitovat množství oplození schopných oocytů v dospělosti. Toto dogma reprodukční biologie, kdy ovarium ztrácí schopnost vytvářet v průběhu života jedince nové oocyty, je předmětem debat již skoro století (Papanicolaou, 1924; Telfer & Anderson, 2019). Skupina Johnson et al., 2004 otřásla tímto dogmatem, když v dospělém myším vaječníku objevila buňky, které by mohly podporovat obnovu zárodečných buněk i postnatálně. Experiment Dyce & Li, 2006 dokonce potvrdil, že zárodečné buňky mohou vznikat i z jiných tkání, v tomto případě z kůže prasete. Od té doby bylo zveřejněno

mnoho experimentů na různých modelových organismech stavějících se pro i proti mechanismu neo-oogeneze a finální konsenzus zatím pravděpodobně ve vědecké obci není (Porrás-Gómez & Moreno-Mendoza, 2017).

1.2 Růst oocyty

Růst oocyty je zahájen po dosažení pohlavní dospělosti nábořem primordiálních folikulů obsahujících primární oocyty v diplotenním stadiu profáze I. U prasat je v pubertě zásoba primordiálních folikulů okolo 420 000 (Telfer, 1996). Před dosažením meiotické kompetence musí oocyt růst, v této fázi dochází k masivnímu zvýšení objemu oocyty a také ke zvětšování a množení folikulárních somatických buněk.

Oocyt syntetizuje látky důležité pro svůj růst, vývoj a maturaci. Dochází k reorganizaci cytoplazmy a k redistribuci mitochondrií, které mění svůj tvar. Strukturální změny probíhají na úrovni Golgiho aparátu (GA), endoplazmatického retikula (ER) a multivezikulárních tělísek (Wassarman & Josefowicz, 1978).

Golgiho aparát se zvětšuje a rozpadá na menší jednotky, které se nacházejí v oblasti kůry, odkud transportují glykoproteiny podílející se na vzniku *zona pellucida*. Glykoproteinový průhledný obal – *zona pellucida* – je produkován rostoucím oocytem a vzniká v perivitellinním prostoru primárního folikulu. Tento ochranný obal se u myši skládá ze tří *zona pellucida* sperm-binding proteinů (ZP) – ZP1, ZP2 a ZP3 (Bleil & Wassarman, 1980). ZP1 propojuje ZP2 a ZP3, ZP3 je primární receptor spermií spouštějící akrozomální reakci a ZP2 se chová jako sekundární receptor pro spermiu. V případě prasete se *zona pellucida* skládá ze čtyř glykoproteinů – ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4 (Wassarman, 1988).

ER se akumuluje v průběhu zrání pod plazmatickou membránou oocyty s výjimkou microvilli-free oblasti a spolu s kortikálními granuly se podílí na kortikální reakci zabraňující polyspermii při oplození (Mehlmann et al., 1995). Kortikální granula jsou malé membránové orgány nacházející se pod oolemou oocyty, které se při fúzi gamet spojí s oolemou a do perivitellinního prostoru se přemístí proteolytické enzymy. Tyto enzymy modifikují proteiny *zona pellucida*, což má za následek neschopnost navázání dalších spermií (Moller & Wassarman, 1989).

Výrazné změny probíhají i na úrovni jádra, jak oocyt roste, dochází ke zvětšování jádra a ke změně jeho struktury, kolem jadérka kondenzuje chromatin a oocyt je v této fázi ve stadiu zárodečného váčku (germinal vesicle – GV). V okolí jádra se shlukují organely v tzv. Balbianiho tělísko a v průběhu růstu se rozptylují do periferie oocytu (Gosden et al., 1997).

Během růstové fáze oocyt syntetizuje velké množství RNA a proteinů pro využití embryem v dalším vývoji po oplození (Picton et al., 1998). RNA v oocyту je velmi stabilní a je zastoupena z 60–65 % rRNA, 20–25 % tRNA a 10–15 % hRNA (Bachvarova, 1985; Pikó & Clegg, 1982). Transkripce probíhá ve vysoké míře do doby, než je myší oocyt ve $\frac{3}{4}$ svého růstu, poté transkripce klesá a s nástupem meiotického zrání už k transkripci nových RNA nedochází (De La Fuente et al., 2004; Wassarman & Letourneau, 1976).

Během růstu dochází ke zmnožení mnoha organel, výjimkou je centriola, která je přítomna v oogoniích a následně v oocytech do stadia pachytene, poté u většiny savců a drosophily zaniká a nacházející meiotická dělení jsou dokončena bez ní (Cunha-Ferreira et al., 2009; Greenfield, 1966; Szollosi et al., 1972). U savců se tedy v době oplození v oocyту nenacházejí centrioly, centriola je přinesena spermií při oplození (Schatten, 1994).

1.3 Meiotická kompetence

Meiotická kompetence je schopnost oocytu obnovit meiózu a úspěšně projít procesem jaderného zrání. Oocyt nabývá této schopnosti postupně během růstové fáze. Proces meiotického zrání je charakterizován rozpadem jaderné membrány zárodečného váčku, kondenzací difúzního chromatinu na odlišné bivalenty, separací homologních chromozomů a vyloučením prvního pólového tělíska a arestem v metafázi II meiotického dělení. Meiotická kompetence souvisí s cytoplazmatickou zralostí oocytu a týká se schopnosti oocytu být oplozen a vyvinout se ve zdravé embryo schopné úspěšně se vyvíjet ve zdravého jedince (Sánchez & Smits, 2012).

Oocyty skotu a prasat izolované z folikulů o velikosti do 0,5 mm zůstávají i po 24hodinové kultivaci ve stadiu zárodečného váčku a jsou označovány jako zcela meioticky nekompetentní (Eppig, 2001). Za částečně meioticky kompetentní se označují oocyty hospodářských zvířat schopné znovu zahájit meiotické zrání, tedy zahájit kondenzaci chromatinu, rozpustit jadernou membránu, projít procesem rozpadu zárodečného váčku, ale zastavit vývoj ve stadiu první meiotické metafáze

(Motlik et al., 1984). Velikost částečně meioticky kompetentních prasečích oocytů se pohybuje v rozmezí 100 a 110 μm . Plně meioticky kompetentní prasečí oocyty o velikosti 120–125 μm z folikulů větších než 3 mm jsou schopny znovu zahájit meiózu, vydělit první pólové tělísko a dosáhnout stadia metafáze II (Marchal et al., 2002; Motlik et al., 1984).

Samotná velikost folikulu nemusí být spolehlivým ukazatelem kvality oocyty, spolehlivějším indikátorem může být velikost samotného oocyty, jelikož objem cytoplazmy může lépe odrážet množství organel a množství metabolitů nutných pro zrání. Vyšší meiotickou kompetenci na konci zrání mají oocyty s větším objemem, s vyšším počtem rovnoměrně distribuovaných mitochondrií. Vliv má také distribuce a množství lipidových kapének, vezikulů a umístění kortikálních granulí bezprostředně pod oolemou. Meiotická kompetence oocytů se také snižuje s rostoucím věkem samice. (Reader et al., 2017)

1.4 Meiotické zrání

Když se oocyty blíží ke konci růstové fáze, stávají se meioticky kompetentními a mohou podstoupit cytoplazmatické a jaderné zrání (Eppig et al., 2004). Meiotické zrání oocyty je definováno přechodem mezi diakinezí profáze I a metafází II a je doprovázeno rozpadem jaderného obalu, přeskupením kortikálního cytoskeletu a sestavením meiotického věténka. Následně dochází k vyloučení prvního polárního tělíska a druhému arestu v metafázi II, ve kterém oocyt setrvává až do oplození. Proces meiotického zrání je tedy nezbytný pro dokončení meiózy a připravuje oocyt na oplození (Sen, 2013).

Proces zrání zahrnuje kaskádu procesů, které *in vivo* zahajuje preovulační nárůst LH, jenž vede ke snížení hladiny cAMP v oocyty. Vysoká hladina cAMP v oocyty udržuje oocyt v profázi I aktivací protein kinázy A (PKA), což vede k inaktivaci Cdk1/cyklin B komplexu (také M-phase promoting factor (MPF)). PKA stimuluje aktivitu WEE1/MYT1 kinázy, která fosforyluje Cdk1 a tím ji udržuje neaktivní, a oocyt tak zůstává v meiotickém arestu (Conti et al., 2002; Eppig et al., 2004).

Snížení hladiny cAMP tedy vede k defosforylaci Cdk1, dochází k aktivaci MPF a oocyt

obnovuje meiózu (Mehlmann, 2005). Také pokud je oocyt odstraněn z antrálního folikulu, spontánně obnoví meiózu a postoupí do metafáze II (Pincus & Enzmann, 1935).

Oocyty zastavené v profázi I se vyznačují intaktní jadernou membránou a jádro se nazývá GV. Nejviditelnějším projevem obnovení meiózy je vymizení nebo zhroucení GV (GVBD -germinal vesicle breakdown), kondenzace chromozomů a sestavení vřetene metafáze I (MI) (Eppig et al., 2004). Během interfáze se Cdk1-cyklin B komplex nachází pouze v cytoplazmě. V pozdní profázi je většina Cdk1-cyklin B komplexů přemístěna z cytoplazmy do jádra (Hagting et al., 1999).

Cdk1-cyklin B komplex vstupuje do jádra a fosforyluje nukleoporiny, proteiny vnitřní jaderné membrány a laminy (Favreau et al., 1996; Macaulay et al., 1995; Ward & Kirschner, 1990). To má za následek disociaci těchto proteinů od jaderné membrány (Lénárt & Ellenberg, 2003). Laminy depolymerizují, jaderná membrána se odpojuje od laminů a je pohlcena endoplazmatickým retikulem (Terasaki, 1994).

Podle Motlik & Fulka, 1976 se klasifikace GV při GVBD u prasat dá rozdělit na 4 skupiny. GV1 se vyznačuje zřetelným jaderným obalem, jadérkem a chromatinem pouze kolem jadérka ve formě prstenu nebo podkovy, nukleoplazma je jemně zrnitá (Hunter & Polge, 1966). Ve GV2 fázi jsou detekovatelné první známky rozpadu GV, heterochromatin je shlukován na jaderné membráně. V GV3 se struktura kolem jadérka rozpadá a chromatin je distribuován v shlucích lokalizovaných hlavně kolem jadérka a na periferii jaderné membrány. Nukleoplazma ztrácí zrnitost, ale jaderná membrána zůstává neporušena. Jako poslední nastává GV4, kdy dochází k rozpadu zárodečného váčku a jadérko přestává být viditelné. (Motlik & Fulka, 1976)

Během GVBD u myši dochází na budoucích pólech meiotického vřetene také k organizaci centrozomálních proteinů pro nukleaci mikrotubulů, ze kterých následně vzniká centrálně orientované bipolární meiotické vřeteno, které migruje ke kortexu oocyty a je zde přichyceno aktinovou čepičkou (Ai et al., 2009). Mikrotubuly z acentriolárních MTOC (microtubule organizing center) rostou a jsou přivedeny do těsné blízkosti chromozomů krátce po GVBD (Holt & Jones, 2009). Tato organizace je důležitá pro správnou segregaci chromozomů a dvě po sobě jdoucí vysoce asymetrická dělení, která dávají vzniknout malému pólovému tělísku a velkému oocyty (Maro & Verlhac, 2002; Verlhac et al., 2000). Lidské oocyty nemají funkční MTOC a sestavení vřetena závisí na Ran signálních drahách (Holubcová et al., 2015). U prasečích oocytů tyto dráhy

pravděpodobně iniciují nukleaci mikrotubulů z chromatinu. Přítomnost acentriolárního MTOC a jeho funkční význam u prasečího meiotického vřetene nebyla zatím zkoumána (Kim et al., 2019).

Pro sestavení funkčního MI a MII vřetene je nezbytný γ -tubulin, pericentrin a protein NuMa (Nuclear Mitotic Apparatus). γ -tubulin je součástí γ -tubulin ring komplexu (γ -TuRC), který společně s pericentrinem organizuje mikrotubuly do vřetene (Dictenberg et al., 1998; Doxsey et al., 1994; Job et al., 2003). NuMa je během GVBD přesunut z jádra do cytoplazmy, spojuje se s cytoplazmatickým dyneinem/dynactinem za vzniku komplexu a přemísťuje se podél mikrotubulů k pólům vřeténka, kde organizuje a přivazuje mikrotubuly k jeho pólům (Sun & Schatten, 2006).

Při prvním meiotickém dělení dochází k asymetrickému dělení buněk, jakmile vřeténko dosáhne buněčného kortexu. Tím se aktivuje přechod metafáze-anafáze a první pólové tělísko je vyloučeno (Maro & Verlhac, 2002).

Další molekuly spojené s pohybem vřeténka a mikrofilmenty jsou Rho proteiny, forminy, ARP2/3 a myosin, které se podílejí na pohybu a ukotvení vřeténka ke kortexu a polymeraci aktinu (Na & Zernicka-Goetz, 2006; Palazzo et al., 2001; Pollard et al., 2000; Simerly et al., 1998).

První meiotické dělení je unikátní redukční událost, která zajišťuje segregaci homologních chromozomů, zatímco spojení mezi sesterskými chromatidami je zachováno. Sesterské chromatidy zůstávají fyzicky spojeny centromerickým kohezinem, který je chráněn před degradací během meiózy I. Separace obou homologních chromozomů během meiózy I a sesterských chromatid během meiózy II je závislá na tažné síle mikrotubulů, které se připojují k centromerickému chromatinu kinetochor. Separace je také závislá na degradaci kohezinu. Komplex podporující anafázi (APC/C) je zodpovědný za degradaci kohezinu mezi chromozomy. Při přechodu metafáze-anafáze APC/C degraduje sekurin, který udržuje inaktivní proteázu separázu. S nástupem anafáze pak tato proteáza štěpí prstencovou strukturu kohezinu, a umožňuje tak rozchod homologních chromozomů (MI), či sesterských chromatid (MII). (Holt & Jones, 2009)

Po vydělení prvního pólového tělíška pokračuje oocyt rovnou do meiózy II, nedochází k S fázi a oocyt se zastavuje v druhém arestu v metafázi II (Kishimoto, 2003). Arrest v MII způsobuje CSF (cytostatický faktor), jehož součástí je Mos-MAPK signální dráha, která udržuje aktivní MPF a inhibuje APC/C (Madgwick & Jones, 2007; Sagata, 1996; Wu et al., 1997). Teprve po oplození či partenogenetické aktivaci se zvýší intracelulární hladina vápníku, dochází k aktivaci APC/C a

následné degradaci cyklinu a sekurinu, což má za následek opuštění druhého meiotického arestu, dokončení druhého asymetrického buněčného dělení a extruzi druhého pólového tělíska (Jones, 2005). Ve druhém meiotickém dělení jsou díky rozpadu kohezinu sesterské chomatydy segregovány jako v mitóze.

Kondenzace a kompaktace chromatinu probíhá v buňce na různých strukturálních úrovních a je nezbytná pro rychlou kongresi a přesnou segregaci chromozomů během buněčného dělení. Primární organizace DNA v chromatinu je kompaktace pomocí nukleozomů (Kornberg, 1974). Tato opakující se podjednotka chromatinu je tvořena dimery bazických histonových proteinů H2A, H2B, H3 a H4 tvořící oktamer, kolem kterého se obtáčí 147 párů nukleových bází DNA (Luger et al., 1997).

Tyto histonové proteiny podléhají na svých C a N-koncích rozsáhlé řadě reverzibilních kovalentních modifikací, jako jsou např. acetylace, metylace, ubikvitinace či fosforylace (Kouzarides, 2007). Tyto post-translačně modifikované C a N-konce hrají důležitou roli nejen při kompaktaci chromatinu do struktur vyššího řádu, ale také v regulaci genové exprese a replikaci a opravách DNA (Bowman & Poirier, 2015). Řada těchto modifikací přímo moduluje sílu vazby mezi histonovým oktamerem a přilehlou DNA, jelikož tyto modifikace mění náboj nukleozomu, a ovlivňují tak jeho stabilitu a přístupnost DNA pro různé faktory genetické exprese (Brehove et al., 2015).

Epigenetický vzorec chromatinu oocyty i spermie silně ovlivňuje vzorce modifikací chromatinu ve vzniklém embryu. Methylace histonů je hlavním determinantem tvorby transkripčně aktivních a neaktivních oblastí genomu a je klíčová pro správnou epigenetickou remodelaci během tranzice vysoce diferencovaného oocyty a spermie na totipotentní embryo (Sha et al., 2019; Vastenhouw et al., 2010). Před aktivací embryonálního genomu je raný embryonální vývoj kontrolován maternální RNA a proteiny, které jsou během časného vývoje degradovány a další vývoj je na maternálních zásobách nezávislý (Lee et al., 2014). Během aktivace embryonálního genomu je metylace na lysinu H3 regulována lysin metyltransferázami a demethyltransferázami a na výsledném vlivu se podílí i počet přidaných metylových skupin. Námi sledovaná H3K4me2 vzniká demethylací H3K4me3 a obě tyto modifikace jsou považovány za aktivátory transkripce (Barski et al., 2007; B. Li et al., 2007). Při snížené oocytární H3K4me2 metylaci či knockoutu H3K4 demethyltransferáz je následně u myši ovlivněna *de novo* metylace imprintovaných genů, aktivace embryonálního

genomu, fertilita či fyziologický embryonální vývoj (Ancelin et al., 2016; Ciccone et al., 2009; Kim et al., 2015).

H3K9 může být acetylován, a být tak spojen s aktivací transkripce podobně jako metylace H3K4, nebo v případě H3K9 je jeho tri-methylace spojována s umlčením transkripce navázáním heterochromatin proteinu 1 (Bannister et al., 2001). H3K9me3 potlačuje expresi genů v oblastech genomu bohatých na repetice, jako jsou centromerické a telomerické oblasti (Almouzni & Probst, 2011; García-Cao et al., 2004), tak i v oblastech s geny kódujícími proteiny, což je důležité pro další vývojový osud buněk (Nielsen et al., 2001). Podílí se i na represi Xist, a pomáhá tak k inaktivaci jednoho z X chromozomů během časného embryonálního vývoje (Fukuda et al., 2014). Methylace H3K9 také řídí a udržuje metylaci DNA, která je spojována s absencí metylace H3K4 a prezencí metylace H3K9 (Laurent et al., 2010; Rothbart et al., 2012).

Ke změnám během meiotického zrání dochází také na úrovni cytoplazmy. Ke změnám na úrovni struktury, funkce a distribuce dochází u ER, GA, mitochondrií a kortikálních granul (KG).

Při splynutí gamet je ER důležitou organelou generující přechodné zvýšení koncentrace intracelulárního volného Ca^{2+} (Swann & Yu, 2008). U myši jsou v oocyty ve fázi GV neorganizované a nepolarizované shluky ER napříč ooplazmou. Ve fázi MII má poté ER podobu sítě rozprostírající se přes celou buňku a shlukující se ve velkých elementech u kortexu oocyty, tyto elementy jsou polarizované a nenacházejí se v oblasti bez mikrokvlků nad vřeténkem (Mehlmann et al., 1995). Skupina Mann et al. na lidských oocytech pozorovala podobnou distribuci ER během zrání s tím rozdílem, že shluky ER se u MII nacházely v celé buňce bez polarizace vůči vřeténku (Mann et al., 2010).

GA tvoří u myši v GV fázi “mini-cisterny” a po GVBD tyto útvary fragmentují a rozprostírají se po ooplazmě (Moreno et al., 2002). Kortikální granula, na jejichž vzniku se podílí GA, fúzíjí po splynutí gamet s oolemou (Moller & Wassarman, 1989). Vznikají u hlodavců ve fázi primárního folikulu, u člověka ve fázi sekundárního folikulu a jsou rozptýleny v cytoplazmě, odkud v průběhu zrání migrují pomocí mikrofilament do kortexu oocyty (Szollosi, 1967; Baca & Zamboni, 1967; Sun et al., 2001).

Dostatečné množství funkčních mitochondrií, mtDNA a ATP (adenosintrifosfát) jsou také ukazateli kvality oocyty. Zrání oocyty vyžaduje velké množství ATP pro nepřetržitou transkripci a translaci.

Také rekombinace a sestavení vřeténka jsou náročnými energetickými procesy. Během zrání se mění kvantita, kvalita a distribuce mitochondrií v oocyty (Van Blerkom, 2011).

Ačkoli se podle Cran, 1985 počet mitochondrií u prasete během přechodu z GV do MII fáze snižuje, během zrání se zvyšuje počet kopií mtDNA v jednotlivých mitochondriích (Spikings et al., 2007). Zrání oocytů, oplození a časný vývoj embryí u prasat jsou spojeny se změnami v aktivní mitochondriální distribuci (Sun et al., 2001). Protože mitochondrie syntetizují většinu ATP a slouží jako vnitřní zdroj Ca^{2+} , je možné, že se mitochondrie redistribuují a koncentrují ATP a Ca^{2+} v místech budoucího využití (Ducibella et al., 1977; Li & Fan, 1997). V GV fázi prasečího oocyty se mitochondrie nachází v kortexu oocyty spolu s endoplazmatickým retikulem (Cran, 1985). V době GVBD začínou mitochondrie fúzovat, což vede ke snížení počtu mitochondrií a dochází k jejich hromadění kolem rozpadající se jaderné membrány (Sun et al., 2001). Před extruzí pólového tělíska u prasete se mitochondrie spolu se všemi ostatními organelami vzdalují od meiotického vřeténka a vytvářejí shluky, které jsou distribuovány po celé cytoplazmě. U myši dochází před GVBD k rovnoměrné distribuci mitochondrií v oocyty, při GVBD k perinukleární akumulaci jako u prasečího oocyty (Tokura et al., 1993). Ačkoli je ATP nahromaděný během zrání pravděpodobně důležitý během oplození a vývoje embrya, při jeho syntéze dochází i ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS). Pokud nedochází k regulaci ROS, dochází k oxidativnímu poškození, což má za následek zhoršenou mitochondriální funkci, která dále přispívá k tvorbě kyslíkových radikálů a snížení produkce ATP (Tarin, 1996). Oxidativní poškození může vážně poškodit funkci oocyty oxidací RNA, DNA a proteinů, vedoucí k poškození integrity buněčné membrány a zkrácení telomer (Rodríguez-Varela & Labarta, 2020). Mutace v mtDNA či v DNA kódující mitochondriální proteiny mohou také vést ke vzniku onemocnění. Poruchy v oxidativní fosforylaci mohou ovlivnit tkáně s velkou energetickou náročností, jako jsou srdce, mozek, příčně pruhovaná svalovina, ledviny a endokrinní systém. Energetické defekty se mohou podílet na vzniku senzorických poruch, vývoji demence a stárnutí. (Wallace, 2010)

1. 5 Folikulogeneze

V první fázi růstu se oocyt zvětšuje paralelně s folikulem, v druhé fázi růstu oocyt stagnuje a zvětšuje se pouze objem folikulu. U hospodářských zvířat dochází k růstu oocyty i během růstu Graafova folikulu před ovulací, kdy během růstu prasečí oocyt zvětší svůj objem z 40 μm na 120 μm (Gosden et al., 1997; Kanitz et al., 2001). Primární folikul vzniká z primordiálního folikulu a je charakterizován přeměnou plochých pregranulózních buněk na buňky kubické. Během dalšího vývoje vzniká sekundární folikul, oocyt pokračuje v růstu, granulózní buňky proliferují a oocyt obklopuje více než jedna vrstva těchto buněk (Eppig, 2001). Kolem nejvzdálenější vrstvy granulózních buněk vzniká bazální membrána a další vrstva somatických buněk nazývaná buňky thekální ohraničující folikul. Tyto buňky se diferencují na dvě vrstvy, *theca folliculi interna* a *externa*, které fungují jako zdroj androgenů pro konverzi na estrogeny prováděnou granulózními buňkami. Vnitřní vrstva (*theca folliculi interna*) se v průběhu folikulogeneze vaskularizuje, zatímco vrstva granulózních buněk zůstává avaskulární (Magoffin, 2005). Tyto preantrální fáze růstu folikulu jsou nezávislé na gonadotropinech, tranzice mezi primárním a sekundárním folikulem je řízena lokálními intraovariálními parakrinními faktory produkovanými oocytem, granulózními a thekálními buňkami (Kol & Adashi, 1995). Mnoho molekul (např. BMP15 – Bone morphogenetic protein 15, GDF9 – Growth differentiation factor 9, activin) účastnících se této signalizace je z rodiny TGF- β (transforming growth factor β) (Harlow et al., 2002).

Komunikace v rámci granulózních buněk a mezi granulózními buňkami a oocytem je klíčová během folikulogeneze. Role gap junction proteinů, spojujících dvě sousední buňky, jako jsou konexiny 43 a 37 (Cx43 a Cx37), hrají důležitou roli při udržování této komunikace. Cx43 je exprimován granulózními buňkami a je nutný k vytvoření gap junctions mezi granulózními buňkami, zatímco Cx37 je zásadní pro komunikaci mezi granulózními buňkami a oocytem (Gittens et al., 2003; Gittens & Kidder, 2005).

Antrální folikul vzniká formací dutiny zvané antrum, kdy se mezi buňkami granulózy hromadí tekutina nazývaná *liquor folliculi* a tyto dutinky poté splývají a vytvářejí dutinu – antrum (Fahiminiya & Gérard, 2010). Folikulostimulační hormon (FSH) je nezbytným faktorem pro vznik antra. Buňky theca produkují pod vlivem luteinizačního hormonu androgeny, které poté granulózní buňky pod vlivem FSH konvertují na estrogeny (Hillier et al., 1994). Granulózní buňky diferencují

v kumulární buňky obklopující oocyt a murální buňky nacházející se kolem antrální dutiny (Eppig, 2001).

Konečným stádiem je preovulační (Graafův) folikul s plně vyvinutým oocytem nacházejícím se na vejconosném hrbolku, který může projít ovulací a následně být oplozen. Ovulace je indukována preovulační vlnou LH a je charakterizována prasknutím stěny folikulu a uvolněním kumulo-oocytárního komplexu (COC), v této době oocyt obnovuje meiózu a postupuje do metafáze II. Kumulární buňky sekretují kyselinu hyaluronovou do mezibuněčných prostorů, a dochází tak k expanzi kumulu. Po ovulaci se buňky granulózy a theca stanou luteálními buňkami a jsou zodpovědné za produkci progesteronu, který je převážně exprimován ve žlutém tělísku (*corpus luteum*) (Eppig et al., 1996).

2. Faktory ovlivňující oogenezi

2.1 MPF (M-phase promoting factor)

Cílem signálu LH při zahájení zrání je M-phase promoting factor (MPF). Aktivita MPF reguluje vstup somatických buněk do mitózy a vstup oocytů do meiozy. Je to heterodimer složený z katalytické Cdk1 (p34cdc2) podjednotky a regulační podjednotky cyklinu B (Hunt, 1989; Nurse, 1990).

Aktivita MPF je vysoce regulována asociací s aktivačními proteiny cykliny a inhibičními proteiny p21cip a p27kip a také pomocí fosforylace a defosforylace (Morgan, 1995). Během meiotického arestu oocytů ve stadiu profáze I během růstu oocytu je MPF fosforylován inhibičními proteiny, jako jsou Wee1/Myt1 kinázy (Han et al., 2005). K fosforylaci dochází na dvou vysoce konzervovaných zbytcích Cdk1 – Thr14 a Tyr15 – a tato fosforylace udržuje heterodimer v neaktivním pre-MPF stavu (Fattaey & Booher, 1997). Po vlně LH dochází ke zvýšení aktivity PDE3A (cyklické nukleotidové fosfodiesterázy 3), která degraduje cAMP, což má za následek snížení aktivity PKA, která by za aktivního stavu inhibovala cdc25 a aktivovala Wee1 (Han & Conti, 2006). Následně dochází k aktivaci fosfatázy cdc25, která defosforyluje Cdk1 na stejných místech, na kterých ji fosforylují inhibiční kinázy, a dochází tak k uvolnění MPF z inhibičního stavu a jeho

aktivaci (Nilsson & Hoffmann, 2000). Aktivace Cdk1 vede k fosforylaci a aktivaci Greatwall kinázy, která naopak blokuje inhibitor cdc25 PP2A (protein fosfatáza 2A). PP2A tedy nemůže blokovat cdc25 a může docházet k defosforylaci na CDK1 a je takto ustanovena pozitivní zpětná vazba (Virshup & Kaldis, 2010). Aktivovaná Cdk1 fosforyluje velké množství substrátů, což vede ke kondenzaci chromozomů a rozpadu jaderného obalu (Peter et al., 1990; Sutani et al., 1999). Iniciuje také vznik dělicího vřeténka a rozchod chromozomů (Compton & Luo, 1995; Hunter, 2000).

U savců je cyklin B1 hlavním cyklinem, který řídí vstup a progresi mitózou a meiózou. Hladiny proteinu cyklinu B1 v průběhu cyklu přímo korelují s aktivitou Cdk1 (Bouftas & Wassmann, 2019). V metafázi musí dojít k správnému napojení kinetochor na mikrotubuly, pak dochází k vypnutí spindle assembly checkpointu (SAC) a k aktivaci APC/C, který degraduje cyklin B a securin. APC/C umožní navázání ubiquitinu na cyklin B, což vede k rozpoznání cyklinu proteazomem a jeho následné degradaci (Herbert et al., 2003; McGuinness et al., 2009). To vede k poklesu aktivity MPF a možnosti vstoupení do anafáze. Po meioze I se musí aktivita MPF zase rychle zvýšit, aby nedošlo k přechodu do S-fáze, ale do meiozy II. V metafázi II je MPF stabilizován cytostatickým faktorem (CSF) až do nástupu anafáze II po oplození (Perry & Verlhac, 2008).

2.2 MAP kináza (mitogen-activated protein kinase)

MAP kinázy zprostředkovávají přenos signálu z povrchu buňky do jádra a lze je rozdělit do tří hlavních rodin. U savců jsou to ERK (extracelulárním signálem regulované kinázy), JNK (Jun amino-terminální kinázy) a p38/SAPK (stresem aktivované proteinkinázy) (Morrison, 2012). ERK je rodina serin-threonin proteinkináz, které vyžadují duální fosforylaci na threoninových a tyrosinových zbytcích, aby se plně aktivovaly (Sun et al., 1999).

Kromě MPF aktivuje hormonální stimul také signální dráhu MAPK. MAPK dráha je aktivována před GVBD prostřednictvím proto-onkogenu *c-mos*, jehož produktem je serin/threonin oocyt specifická proteinkináza Mos. V oocytech *Xenopus laevis* začíná syntéza Mos brzy po stimulaci progesteronem, dochází k jeho kumulaci v průběhu zrání a končí krátce před dokončením zrání (Sagata et al., 1988). Po oplození je Mos degradován (Watanabe et al., 1989). Mos aktivuje další MAPK proteiny, MEK a ERK2 (Nebreda & Ferby, 2000). Ribozomální S6

protein kináza p90rsk (RSK) je hlavním substrátem pro ERK2 (Sturgill et al., 1988). Aktivovaná RSK inaktivuje Myt1 kinázu (Palmer et al., 1998), čímž indukuje aktivaci MPF a vstup do meiózy I. MAPK je aktivní současně s MPF, v průběhu meiózy ale narozdíl od MPF jeho hladina neklesá. Udržení dráhy Mos/ERK/p90rsk a zároveň absence Wee1 je důležitá pro vynechání S fáze (Nakajo et al., 2000; Nebreda & Ferby, 2000).

V případě savců se všeobecně uznává, že dráha MAPK je nezbytná pro zrání oocytů, chronologie aktivace MAPK a GVBD je ale nejasná. V případě *c-mos* knock-out myši došlo v oocytech k aktivaci MPF a GVBD i bez aktivní MAPK dráhy (Araki et al., 1996), která se v případě myši aktivuje až po GVBD (Verlhac et al., 1994). Na to navazující další studie naznačují, že pro zahájení meiozy u myši není nutná aktivita MAPK (Colledge et al., 1994; Hashimoto et al., 1994). Podle některých studií dochází u prasat k aktivaci MAPK v době GVBD (Inoue et al., 1995; Lee et al., 2000). Studie Li et al., 2008 ale pozorovala aktivaci MAPK u prasat již před GVBD. U prasat s inhibovaným *c-mos* došlo také k GVBD i přes absenci MAPK dráhy. Hlavní úlohou MAP kináz bude tak u prasat pravděpodobně zvýšení aktivity MPF a arest oocytu v MII (Ohashi et al., 2003). Inhibice MAPK v době přechodu MI-MII v prasečích oocytech brání kondenzaci chromozomů, extruzi prvního pólového tělíska a tvorbě vřeténka MII (Lee et al., 2000). MAP kinázy se tedy u savců podílejí na kondenzaci chromatinu a vytvoření dělicího vřeténka (Verlhac et al., 1994), podílejí se na regulaci asymetrického dělení, extruzi polového tělíska a arest v metafázi II (Gordo et al., 2001; Choi et al., 1996; Petrunewich et al., 2009).

2.3 CSF (cytostatický faktor)

Po dokončení MI oocyty vstupují do MII a zastavují se v metafázi až do oplození v důsledku aktivity cytostatického faktoru (CSF). CSF udržuje aktivní MPF díky inhibici APC/C a zabránění degradace cyklinu B (Sen, 2013). Aktivita CSF se objevuje po MI, postupně roste a zůstává aktivní během dozrávání oocytu a následně se snižuje po oplození (Masui, 2001). Oplození spouští zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} , čímž se aktivuje APC a přechod do anafáze, je to také endogenní signál pro destrukci cyklinu B1 (Nixon et al., 2002). CSF byl poprvé objeven (Masui & Markert, 1971), kdy při jejich experimentu injekcí cytoplazmy ze zralého oocytu do blastomer 2-buněčného embrya došlo k zástavě rýhování. Následně tento

cytoplazmatický faktor zodpovědný za inhibici mitózy pojmenovali cytostatický faktor. CSF nepopisuje jedinou molekulu nebo protein, ale spíše aktivitu několika komplexů. Mos, jakožto produkt proto-onkogenu *c-mos*, je katalytická podjednotka CSF fosforylující další komponenty MAPK dráhy a vedoucí k aktivaci CSF bloku (Sagata et al., 1989). Jeden ze substrátů mos-MAPK-RSK dráhy by mohl být protein Bub1, který po aktivaci RSK následně aktivuje protein Mad2, jenž inhibuje APC/C (Maller et al., 2002; Schwab et al., 2001). Tato inhibice APC/C blokuje degradaci cyklinu B a sekurinu a způsobuje MII arest. Bub1 a Mad2 proteiny se nachází na kinetochorách chromozomů a jsou součástí SAC bránícího předčasnému rozchodu chromatid (Bernard et al., 2001).

Jako další inhibitor byl sledován protein Emi1 (early mitotic inhibitor 1), který měl inhibovat aktivátor APC/C Cdc20. U drápatky byla tato inhibice pomocí Emi1 nezávislá na MAPK dráze (Reimann et al., 2001; Reimann & Jackson, 2002), u myších oocytů sledovali Paronetto et al., 2004 aktivaci Emi1 pomocí RSK. Dalším výzkumem se ale zjistilo, že to není Emi1, kdo se účastní CSF, ale jeho homolog Emi2 (early mitotic inhibitor 1-related protein 1; Erp1) (Tung et al., 2005). Degradace Emi2 po oplození probíhá po jeho fosforylaci pomocí kalmodulin-dependentní proteinkinázy II (CaMKII) a Polo-like kinázy (Plx1), které jsou nezbytné pro výstup z MII (Hansen et al., 2006).

2.4 Cyklické nukleotidy

Cyklické nukleotidy jako cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) a cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) jsou jedny z nejdůležitějších druhých posílů regulujících zrání oocytu (Ratner, 1976). Jsou to molekuly zárodečného a folikulárního somatického původu, které jsou hlavními molekulami odpovědnými za udržení meiotického arestu oocytů (Cho et al., 1974; Rice & McGaughey, 1981). Střední až vysoké intraoocytární hladiny cAMP potřebné k zastavení oocytů v profázi I jsou závislé jak na syntéze cAMP v oocytu (Horner et al., 2003), tak i na difúzi cAMP z kumulárních buněk přes mezerové spoje (gap junctions) do oocytu (Schultz et al., 1983).

Meiotický arest je závislý na cAMP signalizaci přes aktivní G protein (Gs) spojený s adenylylcyklázou (AC) endogenní pro oocyt (Mehlmann et al., 2002). Oocyty syntetizují cAMP prostřednictvím stimulace receptorů spojených s G-proteinem (GPR) přítomných v jejich

plazmatické membráně. Do této rodiny receptorů patří konstitutivně aktivní receptor 3 spojený s G-proteinem (GPR3), který aktivuje Gs k aktivaci AC, jež katalyzuje tvorbu cAMP z ATP (Freudzon et al., 2005; Mehlmann et al., 2004).

Stálá hladina intraoocytárního cAMP aktivuje proteinkinázu A (PKA), která brání aktivaci MPF regulací kinázové aktivity inhibičních proteinů MPF, jako jsou Wee1/Myt1, které fosforylují Cdc2, čímž udržují MPF v jeho neaktivním stavu (Bornslaeger et al., 1986; Han et al., 2005; Han & Conti, 2006).

V oocytech izolovaných z antrálních folikulů dochází k poklesu hladin cAMP souběžně s GVBD (Dekel et al., 1988; Pincus & Enzmann, 1935). K tomuto poklesu dochází pravděpodobně díky enzymatické aktivitě cyklické nukleotidové fosfodiesterázy 3, jež se podílí na degradaci cAMP (Bornslaeger et al., 1984). Její aktivita byla kromě oocyty detekována i v buňkách kumulu prasečích folikulů (Sasseville et al., 2007).

Další regulaci cAMP má na svědomí cGMP produkovaný v kumulárních buňkách, který difunduje mezerovými spoji do oocyty, kde inhibuje PDE3A a tedy hydrolýzu cAMP (Bornslaeger et al., 1984; Norris et al., 2009). Tato inhibice má za následek udržení vysoké hladiny cAMP v oocyty. LH indukuje fosforylaci Cx43, proteinu nacházejícího se v mezerových spojkách, čímž způsobuje zhroucení mezerových spojů mezi kumulem a oocyty, což zabraňuje difúzi cAMP a cGMP do oocyty (Granot & Dekel, 1994). Nízká hladina cGMP v oocyty má za následek ukončení inhibice PDE3A, čímž způsobí hydrolýzu a snížení hladin cAMP v oocyty. Významný pokles cAMP vede k aktivaci CDK1, která iniciuje GVBD.

2.5 Vápník

Ca²⁺ je druhý posel aktivace oocyty a má schopnost indukovat různé buněčné reakce od oplození, diferenciace, proliferace až po apoptózu (Berridge et al., 2000). Cytosolický Ca²⁺ je účastníkem mnoha signálních drah a buňky generují Ca²⁺ signály pomocí vnitřních i vnějších zdrojů Ca²⁺. K influxu Ca²⁺ dochází prostřednictvím různých kanálů řízených napětím, ligandem, druhými posly, mechanicky nebo vyčerpáním zásoby Ca²⁺.

Vnitřní zásoby jsou uloženy v membránovém systému ER a uvolnění z těchto interních

zásob je regulované kanály pomocí inositol-1,4,5-trifosfátových receptorů (InsP3R) a ryanodinových receptorů (RZR) (Yue et al., 1995). Aktivátor těchto kanálů je Ca^{2+} , který je závislý na stimulech působících prostřednictvím různých receptorů nacházejících se na buněčném povrchu, včetně receptorů spojených s G-proteinem a receptorových tyrosinkináz (RTK). Tyto receptory aktivují fosfolipázu C (PLC) (Berridge & Irvine, 1989; Neer, 1995), která hydrolyzuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PtdIns(4,5)P2) na inositol-1,4,5-trifosfát (Ins(1,4,5)P3) a diacylglycerol (DAG) (Berridge & Irvine, 1984). Ins(1,4,5)P3 následně difunduje do buňky a interaguje s InsP3R čímž dojde k uvolnění Ca^{2+} z ER do cytoplazmy (Mikoshiba et al., 1993). Vnější stimul také aktivuje ADP ribosylcyklázu, jež vytváří cyklickou ADP ribózu, která interaguje s RZR (Clapper et al., 1987). RZR může být aktivován také vazbou ryanodinu a kofeinu (Sitsapasan et al., 1995).

Během oplození musí u oocytů dojít ke změně intracelulární hladiny Ca^{2+} a zvýšení pH pro zajištění správného fyziologického vývoje (Nuccitelli, 1991). Po fúzi spermie s plazmatickou membránou oocyty dochází k aktivaci oocyty, která je charakterizována exocytózou kortikálních granul, uvolněním oocyty z arestu metafáze II a vyloučením druhého pólóvého tělíska, po kterém následuje formace samčího a samičího prvojádra a následný vstup do embryonálního mitotického buněčného cyklu. (Machaty et al., 2017) Všechny tyto události závisí na oscilačních vlnách Ca^{2+} po oplození způsobené pro spermii specifickou fosfolipázou C ζ (Saunders et al., 2002; Stricker, 1999).

Tato specifická PLC zvyšuje hladinu Ins(1,4,5)P3 stejně jako její další izoformy, a tím podporuje tyto oscilační vlny (Jones et al., 2000; Parrington et al., 1999). Signál Ca^{2+} stimuluje CaMKII, která fosforyluje Emi, dochází k jeho degradaci a aktivuje se APC (Hansen et al., 2006; Lorca et al., 1993).

2.6 Steroidní hormony

Steroidní hormony jsou lipofilní molekuly vznikající procesem steroidogeneze z cholesterolu ve specializovaných buňkách nadledvin, vaječníků a varlat (Tamaoki, 1973). Jsou uvolňovány do krve, odkud mohou volně procházet do buněk tkání, kde se vážou na své cytosolické receptory a například řídí transkripci různých genetických elementů (Baxter et al., 1972). V nepřítomnosti

hormonů se steroidní receptory nacházejí v cytoplazmě a po navázání hormonu u nich dochází k aktivaci nebo transformaci, což vede ke zvýšené afinitě receptoru k vazebným místům v jádře (Maurer & Chalkley, 1967; Yamamoto, 1974). V jádře se tento komplex receptor-hormon chová jako transkripční faktor, který se váže na specifická místa v okolí genů (Robinson-Rechavi et al., 2003).

Steroidní hormony se mohou vázat i na receptory v plazmatické membráně a působit tak nengenomickou cestou spouštějící různé signální dráhy interakcí s G proteiny, iontovými kanály či aktivací MAPK (Simoncini & Genazzani, 2003).

Pohlavní steroidní hormony zahrnují estradiol a progesteron syntetizované převážně v samičích vaječnících a testosteron a dihydrotestosteron, které jsou syntetizovány převážně v samčích varlatech. Estrogenní a androgenní třídy steroidních hormonů společně řídí vývoj sekundárních pohlavních znaků a regulaci reprodukce u samců a samic.

Estrogen stimuluje folikulární odpověď na gonadotropiny a ovlivňuje působení FSH na buňkách granulózy a LH na buňkách theca. Sekrece LH a FSH je řízena neurosekrecí hormonu uvolňujícího gonadotropin (GnRH), který je produkován nervovými buňkami nacházejícími se v hypotalamu, odkud je transportován do přední hypofýzy, kde stimuluje syntézu a sekreci LH a FSH (Krsmanović et al., 1993; Levine, 1997). Estrogen působí negativní zpětnou vazbou na sekreci GnRH a LH, dokud jeho zvýšená sekrece nevyvolá předovulační nárůst GnRH a následný nárůst LH, který spouští ovulaci (Knobil, 1974, 1980).

Progesteron je steroidní hormon patřící do třídy hormonů nazývaných gestageny. Je vylučován žlutým tělískem – dočasnou endokrinní žlázou, které vzniká po ovulaci. Progesteron připravuje endometrium na implantaci oocyту, inhibuje také svalové kontrakce v děloze a ovulaci. Pokud nedojde k implantaci oocyту a následnému vývoji embrya, žluté tělísko zaniká. (Stouffer, 1990) Podle Jamnongjit et al., 2005 je progesteron nejhojnějším ovariálním steroidem u myší, a proto je pravděpodobně primárním steroidem regulujícím meiotické zrání.

Estradiol (E2) je hormon z řady estrogenů, jehož funkcí je umožnit vývoj a následně udržet funkci reprodukčního systému. Buňky theca syntetizují nejprve testosteron jako androgenní prekurzor granulózním buňkám, které syntetizují z testosteronu estradiol (Simpson et al., 1994). Funkce E2 je zprostředkována vazbou na estrogenové receptory (EsR) třídy alfa (EsR α) a beta (EsR β) kódované geny *ESR1* a *ESR2*. Tyto solubilní receptory mohou přecházet mezi cytoplazmou a

jádrem a v DNA se vázat na estrogen responzivní elementy, a tak modulovat transkripci. Mohou se vázat i na jiné transkripční faktory či působit negenomickou cestou (Zhao et al., 2010). E2-EsR komplex je schopen iniciovat uvolnění Ca^{2+} do cytoplazmy, aktivovat fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K), ERK nebo regulovat transkripci guanylátcyklázy v granulozních buňkách, a tak ovlivňovat produkci cGMP a ovlivňovat tím meiotický blok (Hammes & Levin, 2007; Liu et al., 2017; Zhang et al., 2010). Během estrálního cyklu způsobují zvýšené hladiny estradiolu dozrávání a uvolňování oocyty a nárůst děložní výstelky. Strukturálně podobné látky E2 jako například BPA a BPS mají afinitu k EsR, a mohou tak nepříznivě ovlivňovat signální dráhy s tím spojené (Fang et al., 2003). Podle Žalmanová et al., 2017 BPS ovlivňuje expresi mRNA pro $\text{EsR}\alpha$ a $\text{EsR}\beta$ v oocyty. Doshi et al., 2011 pozorovali alternaci genové exprese $\text{EsR}\alpha$ a $\text{EsR}\beta$ u dospělých varlat po expozici BPA u novorozenech myši. PF201 jako nástupce těchto chemikálií zatím nebyl v tomto ohledu dostatečně zkoumán, a proto je vlivu PF201 na expresi mRNA těchto receptorů věnována pozornost v experimentální části této práce.

3. Reprodukčně toxické látky

Každý rok se ve světě vyrobí velké množství chemikálií, z nichž některé mohou mít nepříznivý vliv na reprodukční zdraví lidí a zvířat, a navíc se mohou kumulovat v životním prostředí. K expozici člověka těmito látkami dochází několika cestami na mnoha místech, a pro velkou část společnosti je tak nevyhnutelná. Celkový vliv těchto látek rozšířených v životním prostředí ve vztahu k reprodukčnímu zdraví je kvůli mnoha faktorům obtížné sledovat. Rim, 2017 a několik dalších studií sledujících expozici zaměstnanců na pracovišti spolu s výsledky z experimentů prováděných na zvířatech naznačují, že tyto chemikálie mohou nepříznivě ovlivňovat reprodukci a celkové zdraví člověka. Mezi tyto environmentální kontaminanty představené v této kapitole patří těžké kovy, organická rozpouštědla, ftaláty, pesticidy a chemikálie narušující endokrinní systém.

Těžké kovy jsou všudypřítomné látky znečišťující životní prostředí se známými toxickými vlastnostmi a populace s nimi přichází do styku nejčastěji na pracovišti, v životním prostředí, inhalací cigaretového kouře nebo konzumací kontaminovaných potravin (Amaya et al., 2013). Mezi nejvíce prozkoumané těžké kovy patří olovo, kadmium, arsen a rtuť. Podle Chang et al., 2006 a Choy et al.,

2002 může mít množství olova a rtuti v krvi u žen spojitost s neplodností. Podle Tanrikut et al., 2014 byla detekce kadmia ve vzorku endometriální biopsie spojena s výrazně vyšším rizikem idiopatické neplodnosti. Arsen v pitné vodě u exponované skupiny ve studii Ahmad et al., 2001 znamenal významně vyšší riziko spontánního potratu, předčasného porodu a porodu mrtvého plodu.

Rozpouštědla jsou složkami barev, lepidel, paliv, elektroniky, čistících prostředků, zdravotnických výrobků a jsou široce rozšířené v různých odvětvích průmyslu. Běžně používanými zástupci jsou tetrachlorethylen, toluen a xylen, které jsou všechny spojeny s negativními účinky na reprodukci (Lindbohm et al., 1990; Sallmén et al., 1995). Hlavním způsobem expozice je inhalace, rozpouštědla jsou snadno absorbována plicemi, trávicím traktem a kůží (Rim, 2017). Neplodnost, nízká porodní váha, riziko spontánního potratu a další jsou spojeny s kontaktem s rozpouštědly (Chen et al., 2000; Sallmén et al., 2008; Taskinen et al., 1989).

Ftaláty jsou chemikálie určené ke změkčení a zvýšení ohebnosti plastových výrobků. Nacházejí se také v lepidlech, stavebních materiálech, předmětech osobní hygieny, detergentech, barvách, léčivech, potravinářských výrobcích a textiliích. Nejpoužívanější ftaláty jsou di-(2-ethylhexyl)ftalát (DEHP), diisodecylftalát (DIDP) a diisononylftalát (DINP). U mužů bylo v souvislosti s ftaláty a jejich metabolity sledováno poškození DNA, snížená koncentrace spermií, životaschopnost, pohyblivost a nefyziologická morfologie (Duty et al., 2003; Hauser et al., 2006).

Pesticidy jsou velkou heterogenní skupinou chemikálií, které se již dlouho používají k regulaci a odpuzování škůdců v různých oblastech. Jsou selektivně toxické a záměrně jsou šířeny do životního prostředí. K expozici populace může docházet skrze potraviny, pitnou vodu, pracovní prostředí či v domácnosti. Některé pesticidy (např. hexachlorocyclohexan (HCH), dichlordifenyltrichlorethan (DDT), heptachlor, hexachlorbenzen) odolávají degradaci, akumulují se v organismu, a zůstávají tak v životním prostředí desítky let, i když jsou v současné době některé z nich zakázány (Yadav et al., 2015). Vyšší koncentrace HCH a DDT ve spermatu byla spojena s nižším počtem a sníženou pohyblivostí spermií a významně zvýšeným rizikem neplodnosti (Pant et al., 2007). Vliv na plodnost může mít také metabolit DDT, který byl nalezen v krvi všech zkoumaných neplodných žen (Bastos et al., 2013). Pesticidy jsou spojovány také s mnoha druhy rakoviny, jmenovitě varlat, prostaty, vaječníků, prsu a děložního krčku (Mostafalou & Abdollahi, 2017).

Řada z těchto výše zmíněných látek může působit i jako endokrinní disruptory (ED). V roce 1966 Evropská Unie zadefinovala ED jako „*exogenní látky, které mají nepříznivé zdravotní účinky na intaktní organismus nebo jeho potomstvo v důsledku změn endokrinní funkce. Potenciální endokrinní disruptor je látka, která má vlastnosti, u kterých lze očekávat, že povedou k narušení endokrinního systému v neporušeném organismu*“ (European Commission, 1996, s. 5). V roce 2002 pak přišla s definicí Světová zdravotnická organizace a definovala ED jako „*exogenní chemikálie, či směsi chemikálií, které interferují s kterýmkoli aspektem hormonální činnosti a následně nepříznivě působí na intaktní organismus nebo jeho potomstvo či subpopulaci*“ (Damstra et al., 2002, s. 1).

Endogenní hormony uplatňují své fyziologické účinky působením přes receptory, na které se jako ligandy vážou. Velikost účinku a citlivost receptoru na ligand závisí částečně na afinitě hormonu k jeho receptoru, specifitě ligandu a na hojnosti receptoru. Hormony často působí ve velmi malých dávkách, jelikož k vyvolání maximálního účinku dochází při koncentracích ligandu hluboko pod koncentracemi potřebnými k nasycení receptoru (Welshons et al., 2003). Znázorněním odpovědi na velikost dávky hormonu či látek, které interferují s působením hormonů, může být nemonotónní křivka ve tvaru písmene U i její inverze. Při střední koncentraci hormonu tak může docházet k nejvyšší či nejnižší odpovědi organismu na stimul (Vandenberg et al., 2012). S vyšší dávkou tedy nutně nedochází k vyšší odpovědi, jak by naznačovalo toxikologické dogma, závislost je tak nelineární. Naopak při nasycení receptoru může docházet k down-regulaci receptoru a snížení citlivosti vůči stimulu (Piccart et al., 2003). S tím se pojí i schopnost ED působit efektem velmi nízké dávky, kdy se za nízkou dávku zpravidla označuje dávka v rozsahu expozice člověka, nebo dávky nižší, než dávky testované v toxikologických studiích (Welshons et al., 2003).

ED mohou působit v nanomolárním až mikromolárním koncentračním rozsahu a některé vykazují aktivitu na pikomolárních úrovních. Také se podobně jako hormony vážou na estrogení, androgení a thyroideální receptory a působí nelineárním a nemonotónním efektem (Vandenberg, 2014). Po navázání ED na receptor se může chovat jako agonista a vyvolat hormonální odpověď, nebo jako antagonistu váže tento receptor, k odpovědi nedochází, ale receptor je blokován pro svůj přirozený hormon (Kuiper et al., 1998). ED také mohou působit na enzymy účastnící se steroidogeneze a metabolismu hormonů.

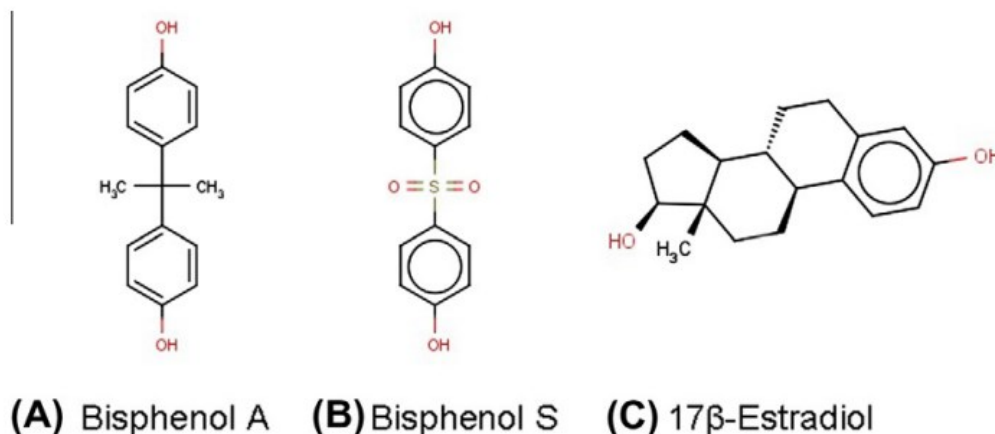
ED mohou také ovlivňovat epigenetické mechanismy, které mění aktivitu genu bez změny sekvence DNA a vedou k modifikacím, které mohou být přeneseny do dceřiných buněk (Dumasia

et al., 2017). Jedním z epigenetických mechanismů je DNA metylace, kdy dochází k připojení metylové skupiny k cytosinu tvořící 5-metylcytosin a tento metylační vzor DNA ovlivňuje expresi různých genů během vývoje (Ehrlich, 2003). Dalším významným epigenetickým procesem je modifikace chromatinu. Chromatin je komplex nukleozomů sestávajících z histonů a DNA, který slouží ke kondenzaci DNA v jádře. Histony jsou pozitivně nabitě proteiny, na jejichž koncích může posttranslačně docházet k modifikacím sloužícím jako signály při transkripci (Strahl & Allis, 2000). Mezi tyto modifikace patří acetylace, metylace, fosforylace a ubikvitinace a označují se jako histonový kód. Podle Amir et al., 2021 může několik ED modifikovat histonový kód i ovlivňovat DNA metylaci a působit tak nejrůznější defekty spojené nejen s reprodukcí.

Mezi typické zástupce ED patří bisfenoly, jejichž zástupců je mnoho a v následující části se proto zaměřím na pro tuto práci relevantní bisfenol A (BPA) a jeho nástupce bisfenol S (BPS). Bisfenol A, neboli 4,4'-(propane-2,2-diyl)difenol, je chemická látka široce používaná jako monomer při výrobě polykarbonátů, epoxidových pryskyřic, termopapíru a dalších papírových výrobků a je používána při výrobě materiálů určených pro styk s potravinami. Z těchto výrobků se může v podobě monomeru uvolňovat a následně pronikat do těla (Sajiki & Yonekubo, 2004), kde byl naměřen v řadě tělních tekutin – séru, plazmě, moči, folikulární tekutině a dalších (Calafat et al., 2005; Ikezuki et al., 2002). BPA se může vázat na estrogenní, androgenní receptory a progesteronové receptory, které hrají důležitou roli ve vývoji samčího reprodukčního traktu a udržení gravidity (Fang et al., 2003; Kuiper et al., 1998). Dále může ovlivňovat metylaci genů, jelikož aktivace EsR ovlivňuje aktivitu metyltransferáz (Faulk et al., 2015). Také způsobuje poškození DNA zvýšením intracelulárních koncentrací ROS a tím produkci zlomů DNA (Xin et al., 2014).

Pro svůj negativní vliv nejen na reprodukční zdraví byl BPA omezen a nahrazen jinými alternativami, mezi nimi BPS.

BPS, neboli 4,4'-sulfonylbisfenol, se používá jako tvrdidlo, k výrobě fenolové pryskyřice, je na papírových bankovkách a jako vývojka barvy v termopapíru označeném jako „BPA-free“. Narozdíl od BPA je stabilnější pod vlivem tepla a světla (Kuruto-Niwa et al., 2005; Liao et al., 2012). Tato náhrada se neukázala jako šťastná, jelikož i u BPS se prokázal negativní vliv, což naznačuje jeho strukturní podobnost s BPA (Rochester & Bolden, 2015).



Obr. 1 - Strukturní vzorce BPA, BPS a estradiolu, převzato z Grignard et al., 2012

4. Pergafast 201

Pergafast 201 (PF201), neboli N-(p-Toluenesulfonyl)-N'-(3-p-toluenesulfonyloxyphenyl)urea, je chemická látka, která je předmětem našeho zájmu v této diplomové práci, a která spolu s BPS postupně nahrazuje BPA hlavně v papírových produktech, kde slouží jako vývojka barvy. Vervliet et al., 2019 analyzovali složení termopapíru ve 14 zemích z Evropy, Asie, Severní Ameriky a Oceánie. Na analyzovaných produktech se zde stále nejčastěji vyskytoval BPA, následován BPS, a na třetím místě PF201. Jako hlavní zástupce se PF201 objevil na 37 ze 308 zkoumaných vzorků, ale pouze na těch pocházejících z Asie a Evropy. Zvyšující se trend nahrazování BPA bude pravděpodobně nadále pokračovat, jelikož Evropská unie od roku 2020 stanovila limit 0,02 % hmotnosti pro BPA v termopapíru (European Union, 2016). Například v Německu byl v letech 2018 a 2019 PF201 na účtenkách, lístcích a lepících štítcích nejrozšířenější vývojkou barvy, avšak těsně následován BPA (Eckardt et al., 2020). V letech 2015-2017 byl přitom v Německu stále stále nejrozšířenější účtenkovou vývojkou BPA (Eckardt & Simat, 2017).

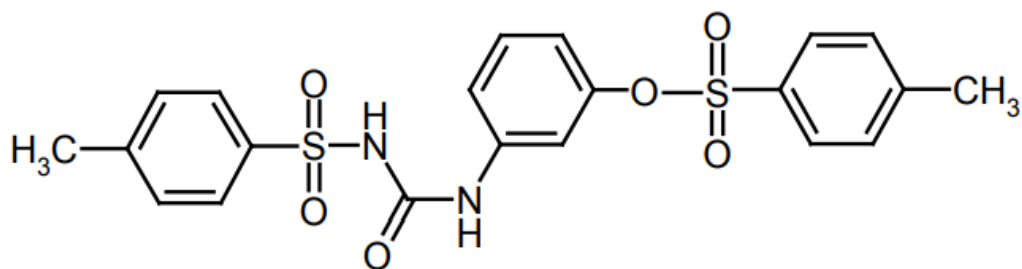
Při manipulaci s účtenkou může také docházet k přenosu PF201 z termálního papíru na pokožku prstu (Eckardt & Simat, 2017). Absorpce BPA kůží byla rozsáhle studována a mimo jiné potvrzena *in vitro* (Toner et al., 2018). Jediná studie zabývající se pronikáním alternativ BPA přes pokožku prstu je od skupiny Reale et al., 2021, v této studii ale permeabilita PF201 nebyla

kvantifikovatelná a množství jiných studií sledující absorpci se nezabývá PF201.

Podle studií Agentury pro ochranu životního prostředí (EPA) pergafast 201 nepůsobil genové mutace *in vitro* ani chromozomální aberace *in vivo*. Podle zde uvedeného omezeného množství studií se pergafast 201 neabsorbuje kůží jako neředěná chemikálie a v roztoku má špatnou absorpci kůží. Kromě toho se pergafast 201 špatně vstřebává z plic a gastrointestinálního traktu (US EPA, 2014).

V současné době existuje pouze velmi omezené množství studií sledující vliv pergafastu na endokrinní systém, PF201 zde nevykazoval estrogenní aktivitu ani neovlivňoval koncentraci volného testosteronu (Goldinger et al., 2015; US EPA, 2014), nicméně steroidogeneze může být ovlivněna i jinými mechanismy. Některé studie se také zaměřily na afinitu PF201 k určitým proteinům asociovaným s neinfekčními onemocněními, ve studii *in silico* skupiny Montes-Grajales et al., 2021 měl PF201 nejvyšší skóre afinity k proteinům asociovaným s kardiovaskulárními chorobami, diabetem, rakovinou plic, děložního čípku a prostaty.

EPA klasifikovala PF201 jako toxický pro vodní organismy, jako látku ve vodním prostředí vyvolávající dlouhodobé nepříznivé účinky a perzistentní v životním prostředí (US EPA, 2014).



Obr. 2 - Strukturní vzorec PF201, převzato z US EPA, 2014

5. Hypotéza a cíle práce

Na základě prostudování dostupné odborné literatury byla stanovena hypotéza, podle které pergafast 201 negativně ovlivňuje meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*.

Pro ověření hypotézy byly stanoveny následující cíle:

1. Sledování vlivu PF201 na meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*
2. Sledování a popsání vlivu PF201 na utváření meiotického vřetene a extruzi pólového tělíska
3. Sledování a popsání vlivu PF201 na metylaci histonů H3K4me2 a H3K9me3 jako markerů epigenetických modifikací
4. Vliv PF201 na expresi mRNA EsR α a EsR β v oocytech během meiotického zrání

6. Materiály a metodika

Chemikálie

Médium 199 (Gibco, UK)

Bovinní fetální sérum (GincoBRL, Life Technologies, Germany)

Gentamicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Hydrogen uhličitán sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Laktát vápenatý (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Lidský choriový gonadotropin (PG 600, Intervet Boxmeer, Holand)

Koňský choriový gonadotropin (PG 600, Intervet Boxmeer, Holand)

PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

NaN₃ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

NGS (Abcam, Cambridge, UK)

Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

Anti- α tubulin primární protilátka (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

Anti-H3K4me2 primární protilátka (Abclonal, USA)

DAPI - 4'6 – diamidino – 2 – fenyindol dihydrochlorid (Thermo FisherScientific, USA)

FITC - Fluorescein-5-izothiokyanát konjugovaná kozí anti-myší IgG sekundární protilátka (T6199)
(Abcam, Cambridge, UK)

TRITC - Tetramethylrhodamine konjugovaná kozí anti-králičí IgG sekundární
protilátka (ab7766) (Abcam, Cambridge, UK)

protilátka (ab184677) (Abcam, Cambridge, UK)

Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Catalog Number 61021, Life Technologies)

High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Catalog number 4387406, Thermo FisherScientific, USA)

Získávání a izolace oocytů

Na jatkách byly odebrány od prepubertálních prasnic vaječníky, které byly následně transportovány v termolahvích do laboratoře. Izolace kumulo-oocytárních komplexů (COC) probíhala metodou aspirace z vaječníků, kdy docházelo k odsátí COC s folikulární tekutinou z folikulů o velikosti 2–5 mm pomocí injekční stříkačky s jehlou velikosti 18G. COC byly následně vloženy do Petriho misky i s folikulární tekutinou a po jejich usazení na dně byly pod mikroskopem selektovány. Pro další výzkum byly vybrány pouze oocyty s ukončeným růstem, tedy ty s homogenní cytoplazmou, velikostí 120 μm vnitřního průměru oocytu a oocyty obklopené nejméně třemi souvislými vrstvami kumulárních buněk.

Kultivace oocytů

Pro kultivaci prasečích oocytů bylo použito modifikované médium M199 obohacené o hydrogenuhličitan sodný (0,039 ml 7,0% roztoku na 1 ml média), laktát vápenatý (0,6 mg/ml), gentamicin (0,025 mg/ml), HEPES (1,5 mg/ml), lidský choriový gonadotropin (hCG) a koňský choriový gonadotropin (eCG) v poměru 13,5:6,6 IU/ml (P.G. 600 Intervet, Boxmeer, Nizozemsko) a 5% fetální bovinní sérum.

Selektované oocyty byly promyty v supernatantu folikulární tekutiny a následná kultivace probíhala ve 4-jamkových kultivačních destičkách (Nunc, Roskilde, Dánsko). V jedné jamce se nacházela kontrola bez PF201 a ve zbylých třech jamkách oocyty ošetřené jednotlivými finálními koncentracemi PF201 (300 pM, 30 nM, 3 μM) rozpuštěného v DMSO. Oocyty byly kultivovány 48 hodin do stádia druhé meiotické metafáze v termostatu s řízenou atmosférou 5 % CO_2 při teplotě 38 °C.

Imunocytochemie

Po uplynutí délky kultivace byly oocyty zbaveny kumulárních buněk pomocí jejich opakovaného nasávání skrze tenkostěnnou kapiláru v promývacím roztoku. Následně byly oocyty promyty ve třech kapkách PBS-PVA a fixovány po dobu 30 minut v 4% paraformaldehydu v PBS.

a) Lokalizace α -tubulinu

Fixované oocyty byly nejprve permeabilizovány po dobu 40 minut v 0,1% TritonX-100 v PBS-NaN₃ a následně blokovány v 5% NGS s 0,1% TritonX-100 v PBS-NaN₃ po dobu 1 hodiny. Poté byly po stejnou dobu při teplotě 38 °C oocyty inkubovány s myší anti- α -tubulin primární protilátkou (T6199) ředěnou 1:1000 v promývacím roztoku (1% NGS s 0,1% TritonX-100 v PBS-NaN₃). Ke čtyřem experimentálním skupinám byla vytvořena i negativní kontrola, tyto oocyty se inkubovaly pouze v promývacím roztoku bez primární protilátky. Následoval 3x oplach v promývacím roztoku a následná inkubace oocytů s kozí anti-myší IgG sekundární protilátkou konjugovanou s FITC (ab7064) po dobu 40 minut bez přístupu světla při teplotě 38 °C. Poté následoval další série tří oplachů oocytů a jejich montování po jednotlivých experimentálních skupinách na epoxidové sklíčko do kapky Vectashieldu s DAPI.

b) Lokalizace histonu H3K4me2 a histonu H3K9me3

Současně s lokalizací α -tubulinu byl lokalizován i histon H3K4me2, postup se shoduje s postupem výše, výjimkou je, že jako primární protilátka byla použita králičí anti-H3K4me2 protilátka (ab7766) ředěná 1:200 v promývacím roztoku a jako sekundární protilátka byla použita anti-králičí IgG protilátka konjugovaná s TRITC a ředěná 1:200 v promývacím roztoku. V případě lokalizace histonu H3K9me3 se postupovalo analogicky, jako primární protilátka byla použita myší anti-H3K9me3 (ab184677) ředěná 1:200 a jako sekundární protilátka byla použita anti-králičí IgG protilátka konjugovaná s TRITC a ředěná 1:100 v promývacím roztoku.

Oocyty s imunocytochemicky označeným α -tubulinem a histonem H3K4me2/H3K9me3 byly montovány do Vectashieldu s DAPI pro lokalizaci a následnou vizualizaci chromatinu.

mRNA analýza

Vzorky pro kvantitativní analýzu mRNA EsR α a EsR β pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase (RT-qPCR) byly připraveny ze zralých oocytů MII (50 oocytů v každé skupině). RNA byla izolována pomocí Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit, Catalog Number 61021, Life Technologies v souladu s návodem k použití. Celková mRNA byla přepsána na cDNA pomocí vysokokapacitního High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit Catalog number:

4387406 v souladu s pokyny výrobce. cDNA byla syntetizována v konečném objemu 100 μ l. Sady specifických primerů byly syntetizovány v souladu se známými sekvencemi pro amplifikaci specifických produktů pro ER α a ER β . Každá PCR reakce byla provedena trojnásobně v celkovém objemu 10 μ l s genově specifickými primery při 500 nM a sondou TaqMan MGB při 200 nM, 5 μ L 2x koncentrovaného Fast TaqMan Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 1 μ L cDNA a vody bez nukleázy až do objemu 1 ml. Systém 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) byl použit pro reakce RT-qPCR s následujícím programem: 95 °C po dobu 20 s následovaných 40 cykly 95 °C po dobu 2 s a 60 °C po dobu 20 s. Expres mRNA byla kvantifikována pro každý enzym pomocí softwaru SDS a aritmetického vzorce $2^{-\Delta\Delta CT}$ v souladu s komparativní metodou Ct59, aby se určilo množství cíle normalizované na endogenní kontrolu GAPDH jako referenční ve vztahu k plně narostlým oocytům.

Konfokální mikroskopie a analýza obrazu

Vytvořené preparáty byly snímány pomocí fluorescenčního mikroskopu Leica DM LB. Následně byla pomocí programu ImageJ hodnocena relativní intenzita fluorescence jako poměr mezi naměřenou průměrnou hodnotou intenzity v oocytech v dané experimentální skupině a průměrnou hodnotou intenzity oocytů ve skupině kontrolní.

Statistická analýza

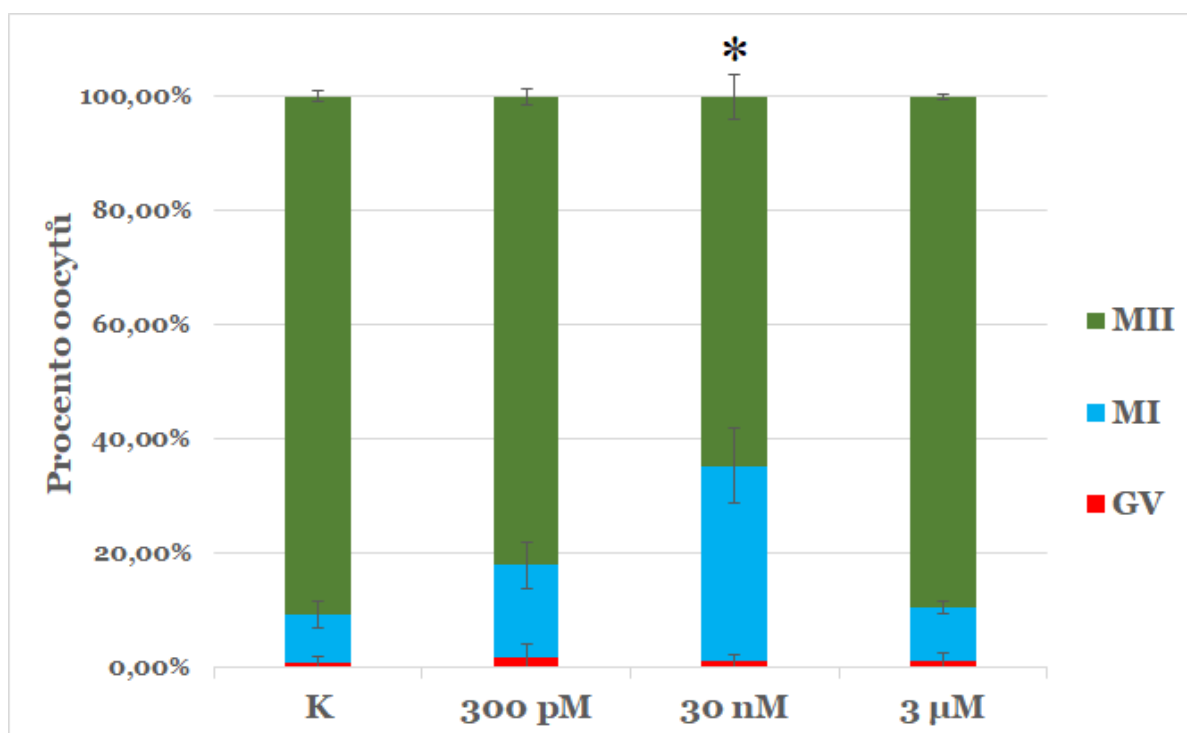
Analýza byla provedena s využitím programovacího jazyka R (v. 4.2.2) v prostředí RStudio (v. 22.12.0+353; RStudio Team, 2020). U prvního a druhého experimentu byla pro srovnání vlivu jednotlivých koncentrací PF201 a kontrolní podmínky použita série chí-kvadrát testů a pro kontrolu společné chyby I. typu (familywise error rate) byla použita Bonferroniho korekce. U třetího experimentu byla pro srovnání intenzity fluorescence u H3K4me2 zvolena jednocestná analýza rozptylu (ANOVA). Pro kontrolu splnění předpokladů testování byly použity grafy reziduí modelu. Jelikož byly porušeny předpoklady normality reziduí a homogenity rozptylů, byla použita robustní jednocestná ANOVA využívající 20% useknutý průměr. 95% intervaly spolehlivosti a p-hodnoty byly získány za využití percentilového bootstrappování o 20 000 vygenerovaných vzorcích. Obdobně byly také použity robustní post-hoc testy využívající useknutý průměr, bootstrappování a korekci p-hodnot na mnohonásobná testování. Použité metody jsou dostupné z knihovny WRS2

(Mair & Wilcox, 2020). Pro srovnání intenzity fluorescence u H3K9me3 byla zvolena jednocestná ANOVA s Tukeyho post-hoc testy. Za statisticky významný byl u všech experimentů považován výsledek s hodnotou $P < 0,05$. U posledního výsledku by vzhledem k nízkému počtu pozorování výsledné efekty byly odhadovány s vysokou mírou nepřesnosti. Statistické testy by trpěly nízkou silou testování a hrozilo by vysoké riziko falešně negativních výsledků (Button et al., 2013). Z těchto důvodů byla pro srovnání použita pouze deskriptivní statistika. Uvedené výsledky je proto nutné považovat za předběžné a explorativní. Formální statistické metody budou použity, až bude k dispozici více pozorování.

7. Výsledky

7.1 Vliv PF201 na průběh meiotického zrání

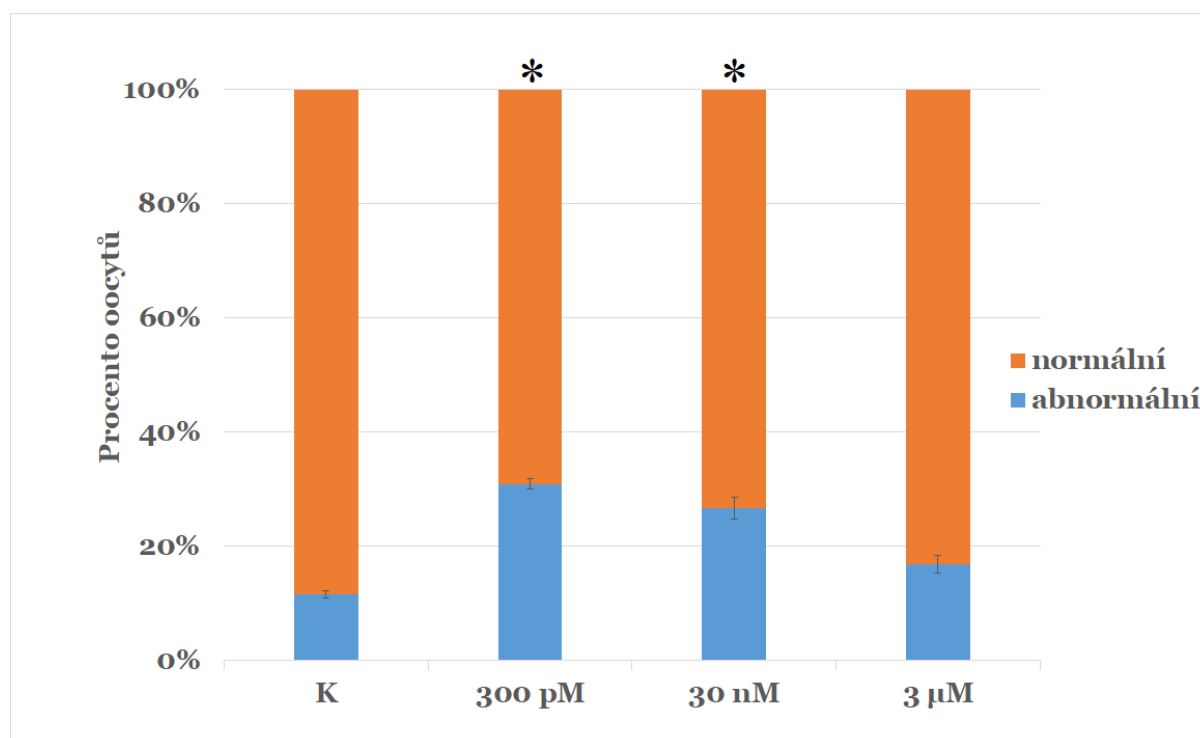
V prvním experimentu byl sledován vliv jednotlivých koncentrací PF201 (300 pM, 30 nM, 3 μ M) na meiotickou progresi prasečích oocytů *in vitro*. Tyto oocyty byly po dobu 48 hodin kultivovány s jednotlivými zmíněnými koncentracemi a následně bylo hodnoceno stádium jejich progresu zrání (GV, MI, MII) na základě morfologie chromatinu. Oocyty po kultivaci v jednotlivých koncentracích zůstaly ve fázi zárodečného váčku (GV), dozrály pouze do stadia první metafáze meiozy I (MI), či dokončily meiotické zrání do druhé metafáze meiozy II (MII). Z grafu č.1 zobrazujícího jednotlivé skupiny v procentech je patrné, že nejvíce oocytů, které nebyly schopny dokončit meiotické zrání, se nachází ve skupině oocytů kultivovaných v 30 nM koncentraci PF201. Jedná se o nelineární efekt.



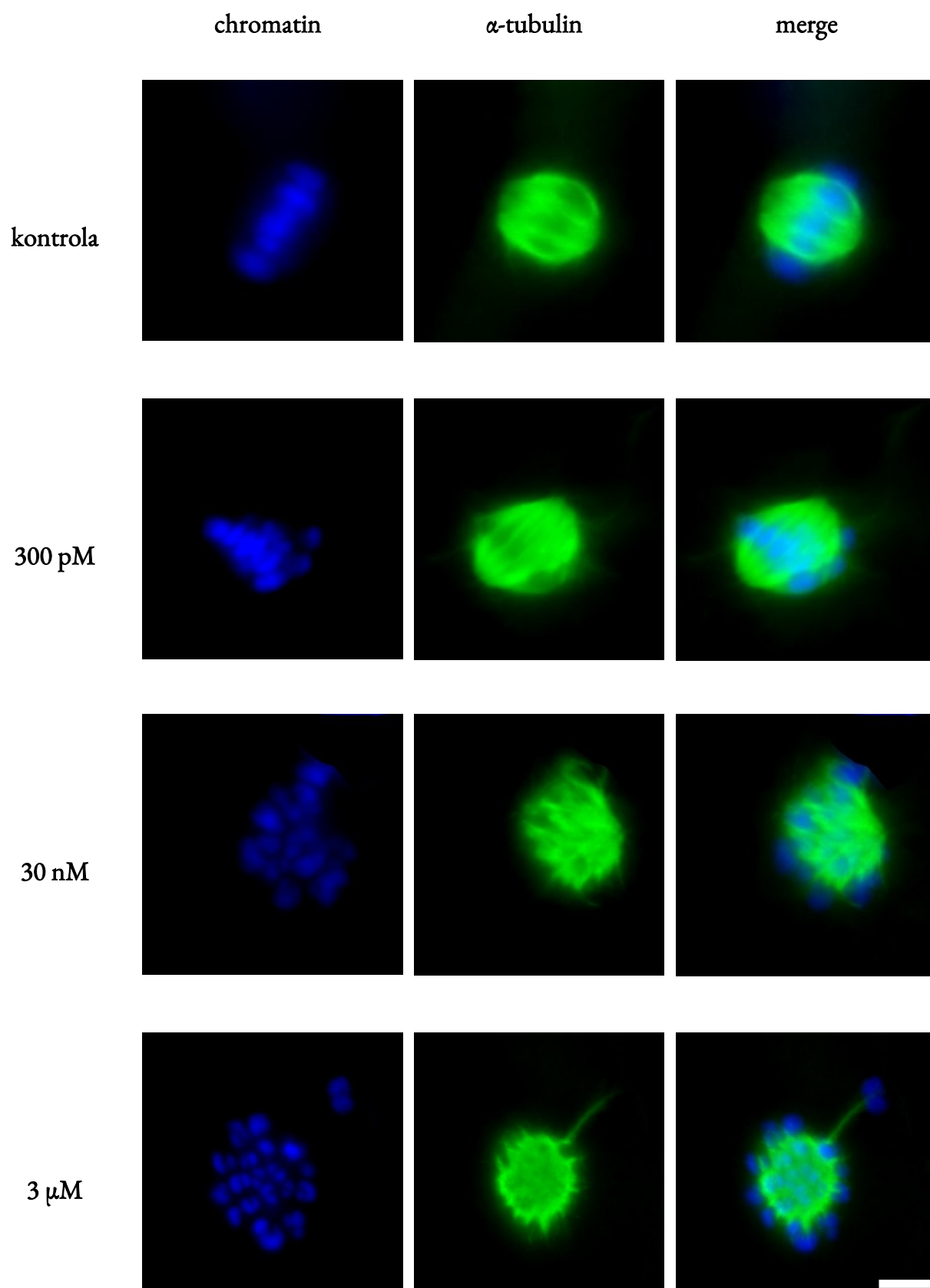
Graf č.1 - Vliv PF201 na průběh meiotického zrání oocytů. GV - nezralý oocyt ve stadiu zárodečného váčku, MI - oocyt v první metafázi meiozy I, MII - oocyt v druhé metafázi meiozy II. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$). Data jsou vyobrazena jako průměrné procento (průměr $\pm$ střední chyba průměru) z nejméně pěti nezávislých experimentů, $n \geq 30$ oocytů na skupinu.

7.2 Vliv PF201 na utváření dělicího vřeténka v průběhu meiotického zrání

V druhém experimentu byl sledován vliv PF201 na utváření dělicího vřeténka u MII oocytů ošetřených PF201 a kultivovaných 48 hodin *in vitro*. Na základě barvení DNA a α -tubulinu byly pomocí mikroskopu pozorovány abnormální změny DV oproti jeho fyziologickému stavu. V kontrolní skupině byla pozorována fyziologická figura DV s ekvatoriálně řazenými a správně napojenými chromozomy. Mezi nejčastější defekty pozorované v PF201 ošetřených skupinách patřilo snížení denzity tubulinových filament, zmenšení DV figury, chybné napojení chromozomu na tubulin a protáhlé póly DV nacházející se daleko od sebe. Defekty tubulinu a uspořádání DV byly pozorovány častěji než nesprávné napojení chromozomu na tubulin. Množství abnormalit u kontrolní skupiny bylo způsobeno nejčastěji výrazně neukotveným vláknem tubulinu, zatímco u pergafastem 201 ošetřených skupin se jednalo o celkovou abnormalitu DV jako takového či špatně napojené chromozomy. Signifikantně vyšší počet abnormálních vřetének byl zjištěn u skupiny oocytů ošetřené 300 pM a 30 nM koncentrací PF201.



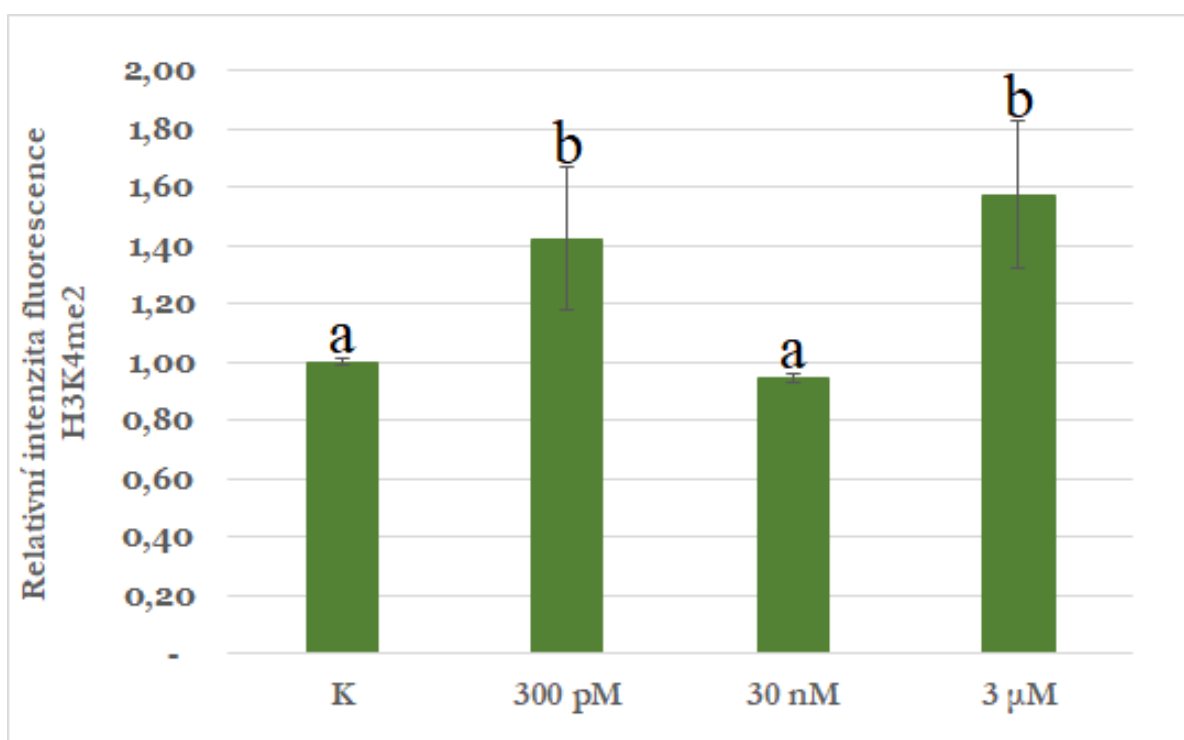
Graf č.2 - Vliv PF201 na utváření dělicího vřeténka v průběhu meiotického zrání. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$). Data jsou vyobrazena jako průměrné procento (průměr $\pm$ střední chyba průměru) z nejméně pěti nezávislých experimentů, $n \geq 30$ oocytů na skupinu.



Obrázek č. 3 - Vizualizace chromatinu (modrá), α -tubulinu (zelená) a pozorovaných defektů u kontrolní skupiny a skupin ošetřených 300 pM, 30 nM, 3 μ M koncentracemi PF201. Sloupec merge představuje spojení obrázků zobrazujících chromatin a α -tubulin. Měřítka pro každý obrázek odpovídá 10 μ m.

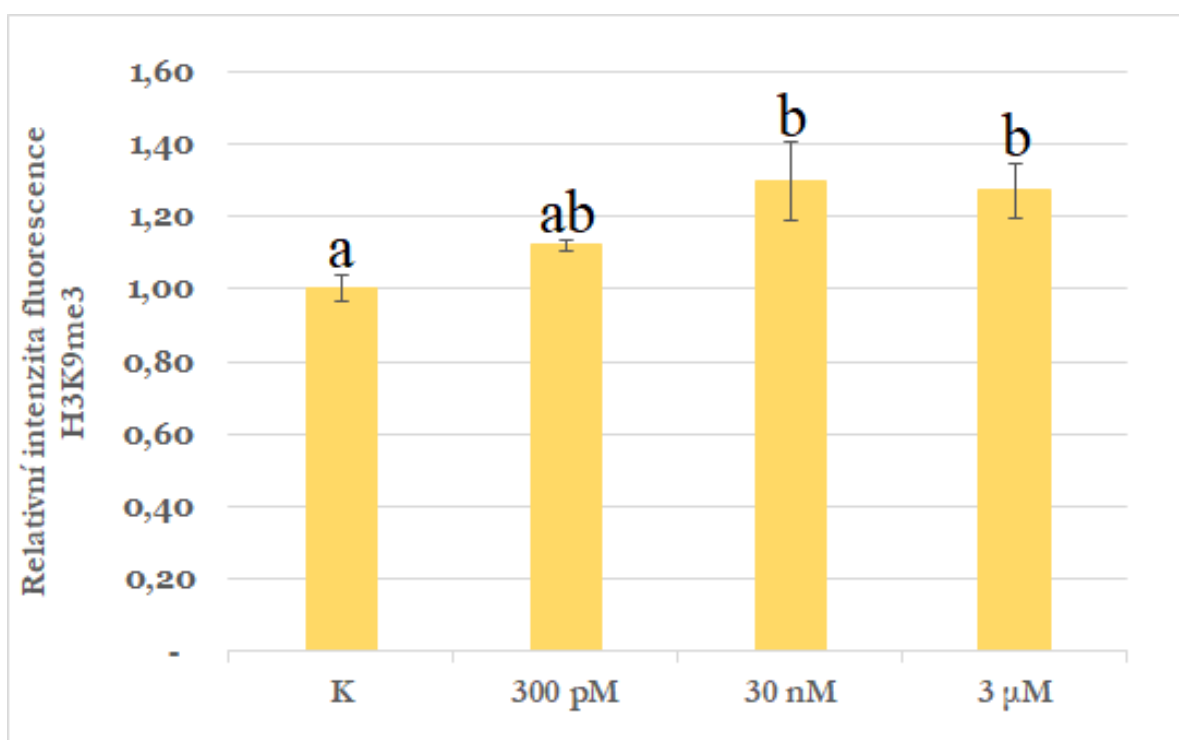
7.3 Vliv PF201 na změnu v metylaci histonů H3K4me2 a H3K9me3

V tomto experimentu byl u skupin ošetřených jednotlivými koncentracemi PF201 (300 pM, 30 nM, 3 μ M) zkoumán jeho vliv na změnu epigenetické metylace histonů H3K4me2 (graf č.3) a H3K9me3 (graf č.4). U jednotlivých skupin koncentrací byla posuzována relativní intenzita fluorescence v porovnání s kontrolní skupinou. U grafu č.3 data ukazují oproti kontrolní skupině a skupině 30 nM statisticky významně zvýšenou relativní intenzitu fluorescence H3K4me2 u skupin ošetřených 300 pM a 3 μ M koncentrací PF201.

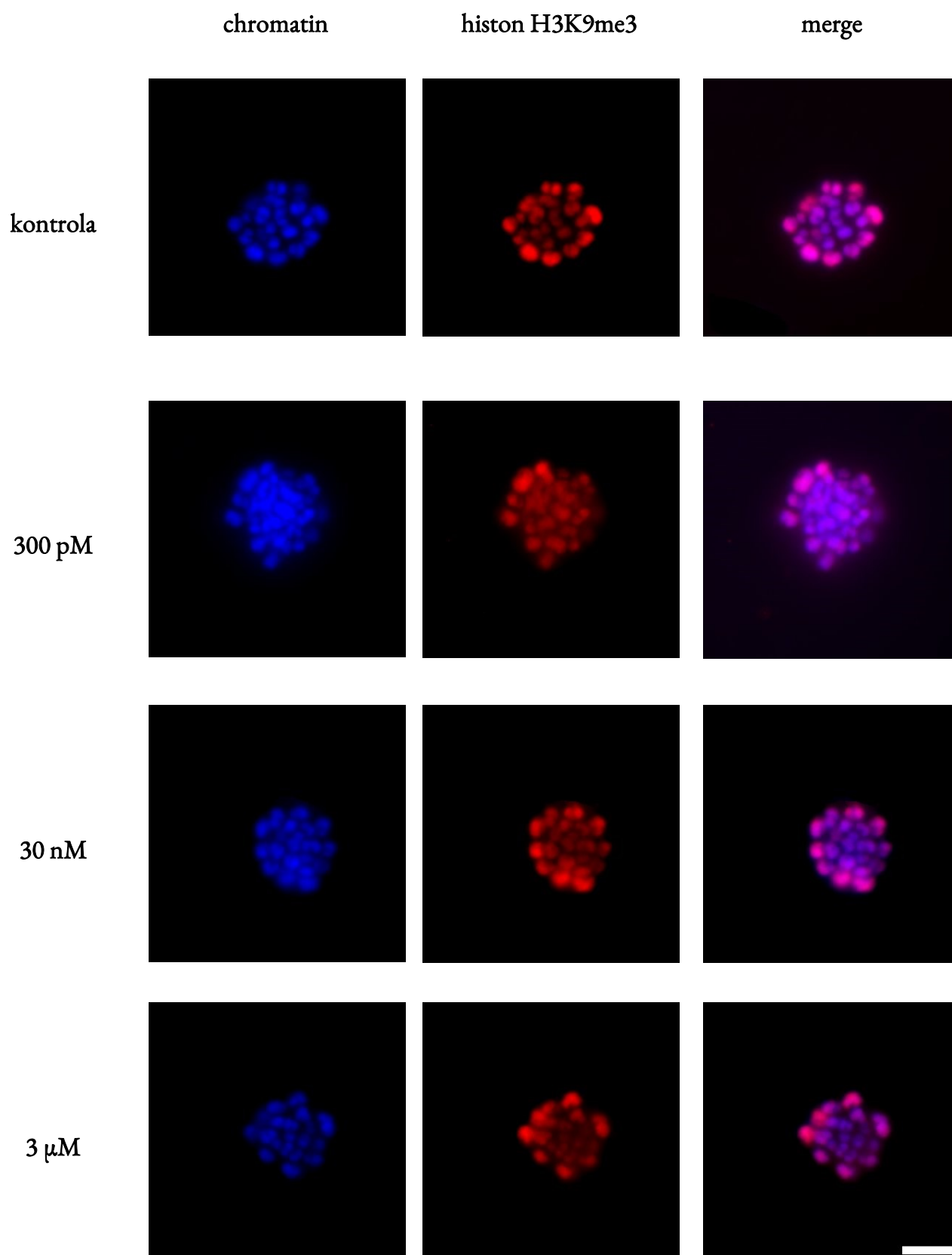


Graf č. 3 - Vliv PF201 na změnu v metylaci histonu H3K4me2. Data jsou vyobrazena jako průměrné procento (průměr $\pm$ střední chyba průměru) z nejméně tří nezávislých experimentů, $n \geq 30$ oocytů na skupinu.

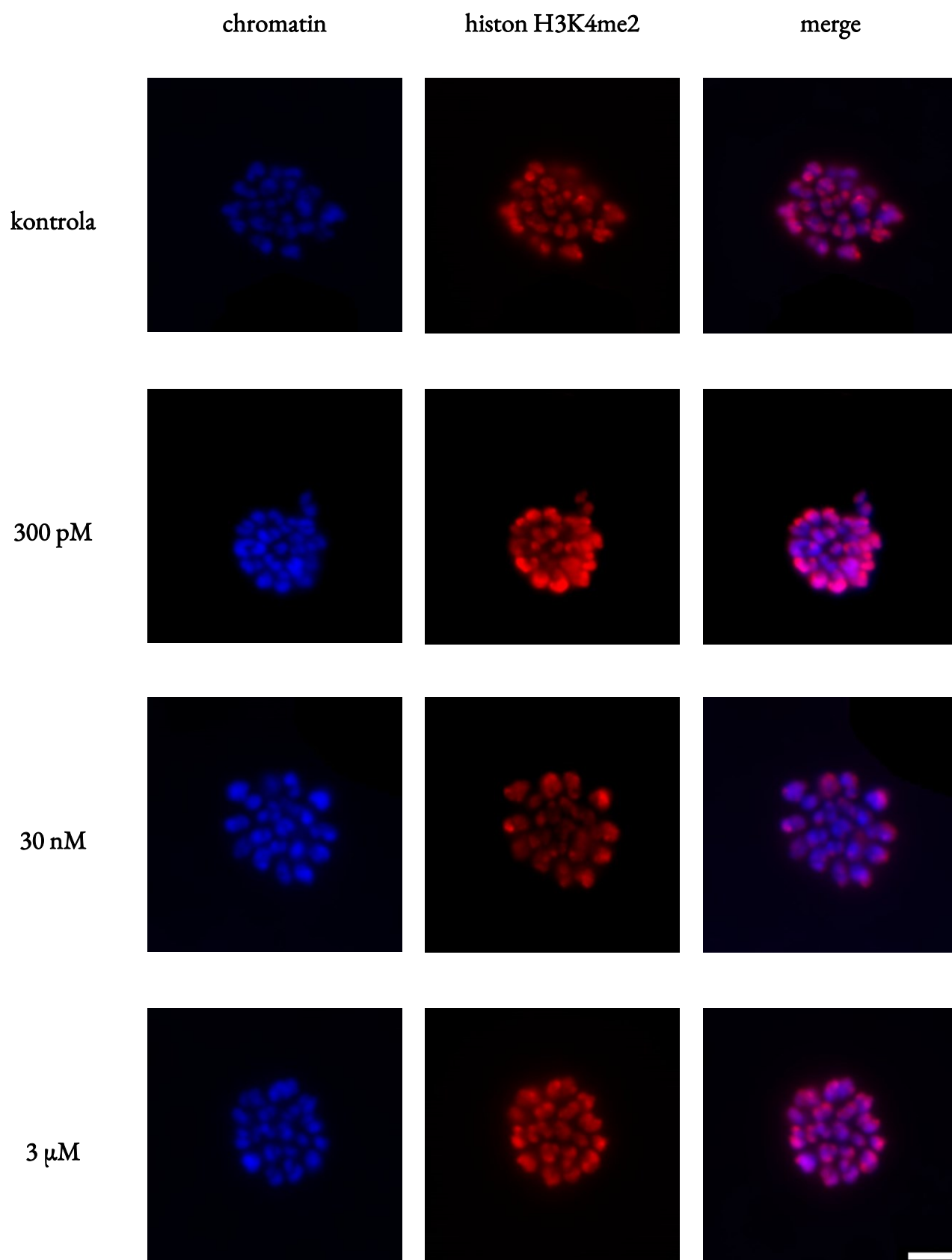
U grafu č.4 data ukazují oproti kontrolní skupině zvýšenou relativní intenzitu fluorescence H3K9me3 u skupin 30 nM a 3 μ M, statistická závislost mezi jednotlivými skupinami je uvedena v grafu.



Graf č. 4 - Vliv PF201 na změnu v metylaci histonu H3K9me3. Data jsou vyobrazena jako průměrné procento (průměr $\pm$ střední chyba průměru) z nejméně tří nezávislých experimentů, $n \geq 30$ oocytů na skupinu.



Obrázek č. 4 - Vizualizace chromatinu (modrá) a H3K9me3 (červená). Obrázky zobrazují kontrolní skupinu a skupiny ošetřené 300 pM, 30 nM, 3 μ M koncentracemi PF201. Sloupec merge představuje spojení obrazů zobrazujících chromatin a H3K9me3. Měřítko pro každý obrázek odpovídá 10 μ m.

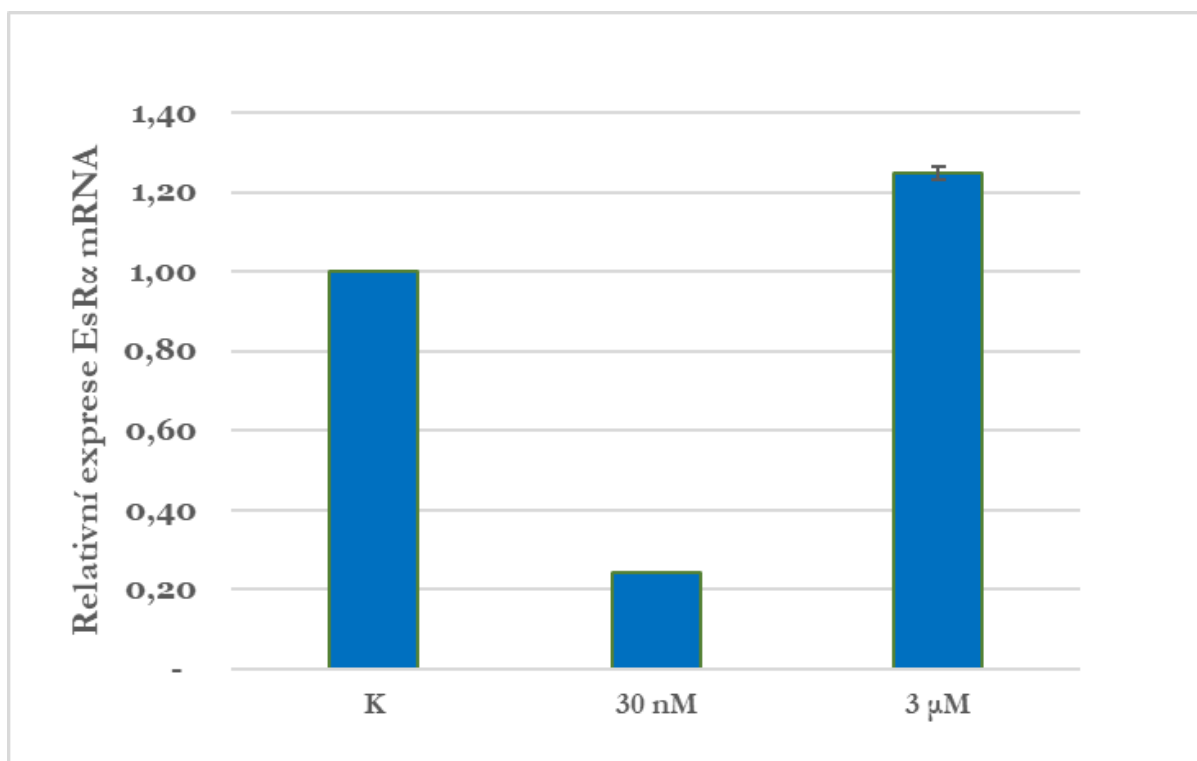


Obrázek č. 5 - Vizualizace chromatinu (modrá) a H3K4me2 (červená). Obrázky zobrazují kontrolní skupinu a skupiny ošetřené 300 pM, 30 nM, 3 μ M koncentracemi PF201. Sloupec merge představuje spojení obrazů zobrazujících chromatin a H3K4me2. Měřítka pro každý obrázek odpovídá 10 μ m.

7.4 Vliv PF201 na expresi mRNA EsR α a EsR β v oocytech během meiotického zrání

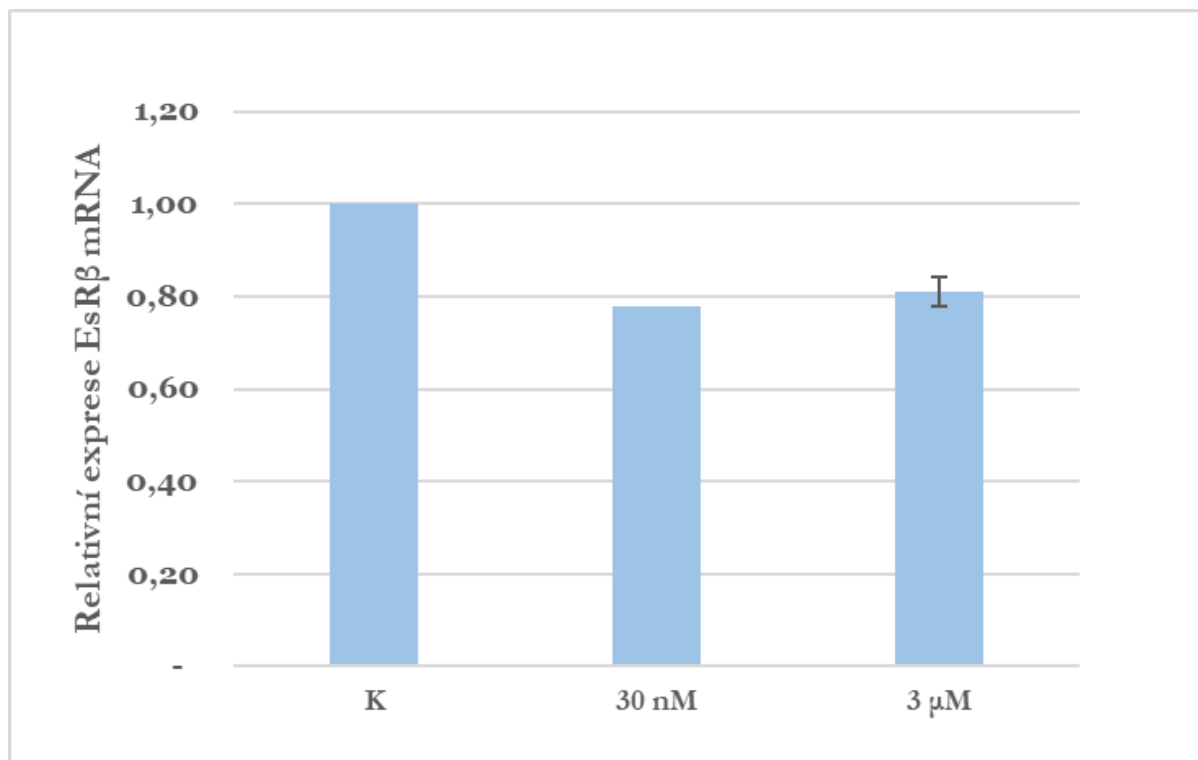
Cílem experimentu bylo změřit relativní expresi mRNA estrogenových receptorů α a β v oocytech ošetřených 30 nM a 3 μ M koncentracemi PF201 po kultivaci 48 hodin *in vitro*. Tyto výsledky zatím nejsou kompletní a chybí skupina exponovaná 300 pM koncentrací PF201. Vzhledem k nízkému počtu pozorování by výsledné efekty byly odhadovány s vysokou mírou nepřesnosti. Statistické testy by trpěly nízkou silou testování a hrozilo by vysoké riziko falešně negativních výsledků (Button et al., 2013). Z těchto důvodů byla pro srovnání použita pouze deskriptivní statistika. Uvedené výsledky je proto nutné považovat za předběžné a explorativní. Formální statistické metody budou použity, až bude k dispozici více pozorování.

U grafu č. 5 můžeme pozorovat sníženou relativní expresi EsR α mRNA u skupiny ošetřené 30 nM koncentrací PF201 oproti kontrole a zvýšenou relativní expresi EsR α mRNA u skupiny ošetřené 3 μ M koncentrací PF201 oproti kontrole.



Graf č. 5 - Vliv PF201 na expresi mRNA EsR α . Data jsou vyobrazena jako průměrné procento (průměr $\pm$ střední chyba průměru) z nejméně tří nezávislých experimentů, $n < 30$ oocytů na skupinu.

U grafu č. 6 můžeme pozorovat sníženou relativní expresi EsR β mRNA ve srovnání s kontrolou u skupin ošetřených 30 nM a 3 μ M koncentrací PF201.



Graf č. 6 - Vliv PF201 na expresi mRNA EsR α a EsR β . Data jsou vyobrazena jako průměrné procento (průměr $\pm$ střední chyba průměru) z nejméně tří nezávislých experimentů, $n < 30$ oocytů na skupinu.

8. Diskuze

Předmětem této práce bylo ověřit hypotézu, podle které má pergafast 201 negativní vliv na vybrané markery meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*, konkrétně na utváření meiotického vřetene a extruzi pólového tělíska, metylaci histonů H3K4me2 a H3K9me3 a expresi mRNA EsR α a EsR β . Podle našeho studia dostupné odborné literatury se domníváme, že se jedná o nový směr výzkumu působení této látky.

PF201 je chemická látka sloužící jako vývojka barvy a je momentálně látkou nahrazující BPA a BPS v příslušných papírových a jiných produktech. Látky, které pergafast 201 nahrazuje se řadí mezi endokrinní disruptory (Rochester & Bolden, 2015; Siracusa et al., 2018). Endokrinní disruptory mají schopnost ovlivňovat reprodukci již v extrémně nízkých dávkách (Vandenberg, 2014). Mohou migrovat z papírových produktů na kůži, případně se kůží vstřebávat a být metabolizovány (Biedermann et al., 2010; Björnsdotter et al., 2017; Ndaw et al., 2018). BPA se může vázat na estrogenní, androgenní a progesteronové receptory, ovlivňuje metylaci genů a způsobuje poškození DNA zvýšením intracelulárních koncentrací ROS (Fang et al., 2003; Faulk et al., 2015; Kuiper et al., 1998; Xin et al., 2014). Kvůli svému negativnímu vlivu nejen na reprodukční zdraví byl BPA omezen a jako jeho bezpečnější alternativa byl postupně na trh uveden BPS (Vervliet et al., 2019). Tato náhrada se však později neukázala jako šťastná a i u BPS byla později potvrzena řada negativních vlivů na reprodukci. Mezi nimi estrogenní aktivita podobná BPA, negativní vliv na oogenezi, výstavbu dělicího vřeténka oocytu a také na morfologii a fyziologii myších vaječníků (Kuruto-Niwa et al., 2005; Nevoral et al., 2018; Žalmanová et al., 2017). EPA označila BPS za vysoce rizikový z hlediska toxicity při podávání opakovaných dávek. Následně klasifikovala PF201 jako toxický pro vodní organismy a jako látku vyvolávající dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí a perzistentní v životním prostředí (US EPA, 2014).

Celosvětově narůstající problémy s reprodukcí a potřeba asistované reprodukce v důsledku špatné kvality spermatu nebo špatné kvality oocytů jsou v současné době častými zdravotními problémy. Pro běžnou lidskou populaci je stále obtížnější vyhnout se expozici chemikáliím narušujícím endokrinní systém a environmentálně toxickým látkám a tato skutečnost by mohla vysvětlovat pokles lidské fertility v posledních desetiletích (Green et al., 2021). V případě PF201 jako relativně nové chemikálie je testování jeho biologického účinku nezbytné pro posouzení rizik

vznikajících pro lidské zdraví a reprodukci vlivem této expozice. V této práci jsme sledovali prasečí oocyty po ošetření PF201 v rozdílných koncentracích v průběhu meiotického zrání *in vitro*. Jelikož práce s lidskými oocyty naráží na řadu etických a právních regulací, byl zvolen model prasečího oocyty, který je svou fyziologií lidskému oocyty blízký (Magnusson, 2005). Průměr velikosti oocytů, doba zrání oocyty, doba potřebná k dosažení 2-buněčného stadia, stadia blastocysty nebo hatchingu blastocysty se u prasete blíží fyziologii lidského oocyty, zatímco u myšího oocyty je tato doba kratší (Santos et al., 2014). Také když je pozorována vývojová fáze aktivace embryonálního genomu, sdílí lidský oocyt řadu podobností s prasečím oocytem narozdíl od nejčastěji zkoumaného myšího modelu. K aktivaci embryonálního genomu dochází u prasete ve fázi 4 buněk, u člověka ve stadiu 4–8 buněk, zatímco u myši nastává ve 2-buněčném stadiu (Jarrell et al., 1991; Jukam et al., 2017). Navíc používání zbytkového materiálu z jatek v podobě vaječníků poražených prasnic použitých k extrakci oocytů má potenciál snížit počet využívaných laboratorních zvířat.

Jelikož byl předchůdce PF201 BPA naměřen v krevním séru, moči a ve folikulární tekutině (ng/ml) běžné populace a jeho absorpce kůže byla potvrzena *in vitro*, lze předpokládat, že jeho vlivu jsou vystaveny vyvíjející se oocyty, případně vyvíjející se embryo (Ikezuki et al., 2002; Toner et al., 2018). Podobně byla potvrzena přítomnost BPS v ng/ml v moči, krevní plazmě a také folikulární tekutině (Amar et al., 2020; Lehmler et al., 2018). Hladiny PF201 v lidských tkáních a tekutinách dosud zjišťovány nebyly, ve dvou studiích byl zkoumán pouze transdermální přechod PF201 (Reale et al., 2020, 2021). Ve studii Reale et al., 2020 byla schopnost chemické látky pronikat kůží měřena v kožních experimentech *in vitro* pomocí difúzní buňky skládající se z donorové a receptorové komory oddělené *ex vivo* získanou lidskou kůží z břicha prstu o tloušťce 800 μm . Zkoumaná chemikálie se v tomto experimentu aplikovala na kůži v donorové komoře a chemikálie nebo její metabolity byly následně kvantifikovány v receptorové tekutině pomocí hmotnostního spektrometru. Z několika zkoumaných náhrad BPA byla celková hodnota v receptorové tekutině pouze u PF 201 vyhodnocena jako neurčitelná. I přes to, že byl PF201 kvantifikován v několika vzorcích, celková hodnota byla nižší než dolní mez kvantifikace. Ve studii Reale et al., 2021 byla použita obdobná metodika s tím rozdílem, že byly použity dvě tloušťky kůže (200 μm , 800 μm) oddělující komory difúzní buňky. Byly zde provedeny dvě analýzy kožní absorpce: analýza kinetiky kožní permeace, kde skupina sledovala absorpci kůží v průběhu času, a analýzu hmotnostní bilance, kde skupina sledovala množství chemikálie nacházející se v různých kompartmentech difúzní buňky

na konci experimentu. V případě analýzy kinetické permeace prostupu kůží u PF201 nemohla být tato hodnota stanovena, protože nebyla v jejich testovacích podmínkách kvantifikovatelná v receptorové tekutině. Hmotnostní bilance PF201 byla pod dolní mezí kvantifikace i v proplachu z donorové komory a v tekutině z receptorové komory. Tyto výsledky by mohly být způsobeny metabolismem PF201, jeho vazbou na proteiny nacházející se na kůži nebo nízkým pH kůže (pH = 5,5), jelikož PF201 je nestabilní v kyselém pH (Eckardt & Simat, 2017). Případnou hydrolýzu v tomto pH naznačuje i nízké množství PF201 v proplachu z donorové komory.

Náš první výsledek se zabývá studiem vlivu PF201 na meiotickou progresi oocyty, na kterém se podílí řada signálních drah a faktorů, jejichž narušení může ovlivnit meiotickou progresi oocyty (viz kapitola Meiotické zrání a kapitola Faktory ovlivňující oogenezi). Testované koncentrace PF201 použité v experimentech (300 pM, 30 nM, 3 μ M) byly zvoleny na základě předběžných experimentů (data nepublikována). V tomto experimentu byl prokázán negativní účinek PF201 na progresi meiotického zrání u skupiny prasečích oocytů ošetřených 30 nM koncentrací PF201 *in vitro*. Po 48hodinové kultivaci oocytů v jednotlivých koncentracích byla hodnocena stadia meiotického zrání jednotlivých oocytů (GV - nezralý oocyt ve stadiu zárodečného váčku, MI - oocyt první metafázi meiozy I, MII - oocyt v druhé metafázi meiozy II), ve skupině ošetřené 30 nM nedosáhl statisticky významný počet oocytů MII fáze, ale pouze stadia MI. V tomto případě se jedná o nelineární efekt (Vandenberg, 2014).

V našem případě jde o první studii zkoumající vliv PF201 na meiotické zrání oocyty a v důsledku nedostatku studií se dá současný výzkum porovnávat pouze v rámci okruhu látek, u kterých byly zkoumány podobné efekty. Mezi tyto látky patří již zmíněné BPA a BPS, které jsou relevantní i svým společným a častým výskytem s PF201 v produktech denní potřeby (Eckardt & Simat, 2017; Vervliet et al., 2019). V případě BPA pozorovala negativní vliv různých koncentrací na progresi meiotického zrání u prasečích oocytů skupina Wang et al., 2016. Lidské oocyty po vystavení BPA měly problém dokončit meiozu ve studii Machtinger et al., 2013. Expozice BPA myších oocytů *in vitro* byla spojena s nižším výskytem MII oocytů a prodlouženým zráním (Can et al., 2005; Lenie et al., 2008).

BPS zkoumala naše laboratoř v koncentracích 3 nM, 300 nM, a 30 μ M a negativní vliv na meiotické zrání u prasečích oocytů *in vitro* v nejnižší použité 3 nM koncentraci byl potvrzen jako

statisticky významný (Žalmanová et al., 2017). Tento negativní vliv BPS se potvrdil i u studie Desmarchais et al., 2020 zkoumající meiotické zrání ovčích oocytů *in vitro*.

Jelikož inhibice MAPK v době přechodu MI-MII v prasečích oocytech brání kondenzaci chromozomů, extruzi prvního pólového tělíska a tvorbě vřeténka MII (Lee et al., 2000), jedna z teorií vysvětlujících zastavení buněčného cyklu vlivem PF201 může být skutečnost, že PF201 svojí vazbou inhibuje nějakou ze složek kaskády fosforylující MAPK (Inoue et al., 1995). Skupina Wang et al., 2016 sledovala míru fosforylace MAPK, která u prasečích oocytů exponovaných BPA byla snížena, což v této skupině korelovalo i se signifikantně sníženým počtem oocytů schopných dozrát do stadia MII.

Vzhledem k nedostatku dat je k prokázání škodlivých účinků PF201 na kvalitu prasečích oocytů prostřednictvím narušení signální dráhy MAPK potřeba množství dalších studií. K objasnění mechanismů působení PF201 je také třeba prozkoumat další signální dráhy a jeho afinitu k různým proteinům.

V našem druhém experimentu jsme se zaměřili na strukturu DV, jehož bezchybná organizace tubulinových filament a napojení chromozomů jsou vlastnosti důležité pro správný průběh meiotického zrání (viz kapitola Meiotické zrání). Vady v sestavení vřeténka a abnormality v uspořádání chromozomů mohou vést k selhání meiotické progrese, selhání oplodnění, vzniku aneuploidie a následnému ovlivnění embryonálního vývoje (Namgoong & Kim, 2018). V tomto experimentu měla kultivace ve všech koncentracích BPS za následek výskyt většího počtu abnormálních dělicích vřeten v MII oocytech. Signifikantně vyšší počet abnormálních vřetének byl zjištěn u skupiny oocytů ošetřené 300 pM a 30 nM koncentrací PF201. Mezi nejčastější defekty pozorované v PF201 ošetřených skupinách patřilo nepravidelné uspořádání vřeténka, zmenšení meiotické figury, chybné napojení chromozomu na tubulin a protáhlé póly DV nacházející se daleko od sebe. Defekty tubulinu a uspořádání DV byly pozorovány častěji než nesprávné napojení chromozomu na tubulin.

V případě BPA pozorovala skupina Wang et al., 2016 negativní vliv různých koncentrací na utváření dělicího vřeténka a zarovnání chromozomů u prasečích oocytů pravděpodobně korelující s již zmíněnou sníženou fosforylací MAPK. Skupina Eichenlaub-Ritter et al., 2008 při expozici BPA *in vivo* u myši pozorovala široká dělicí vřeténka s roztáhlými póly pravděpodobně související se zde také sledovanou negativně ovlivněnou distribucí pericentrinu na pólech DV. Chromozomy mimo

metafázní rovinu a aberace DV pozorovala u myší po expozici BPA *in vitro* také skupina Lenie et al., 2008. Expozice lidských oocytů BPA korelovala s narušeným cytoskeletem mezi MII oocyty i ve studii Machtinger et al., 2013.

Zmenšenou velikost vřeténka, jeho kruhovou formaci nebo astrální uspořádání, nepravidelnou organizaci či snížený počet tubulinových filament pozorovala skupina Žalmanová et al., 2017 u prasečích oocytů *in vitro*, podobné výsledky pozorovala i studie Nevoral et al., 2018 s *in vivo* expozicí BPS u prasečích oocytů.

PF201 podle našich výsledků narušuje tvorbu DV v prasečích oocytech a pravděpodobně působí na uspořádání meiotického vřeténka na více úrovních. Množství výše zmíněných studií vystavující oocyty různých druhů BPA či BPS během meiotického zrání *in vitro* potvrzuje, že tyto látky brání progresi do MII a také narušují sestavení meiotického vřeténka, nicméně základní mechanismy narušení DV těmito látkami zůstávají špatně definovány. Jako jedna z možností se nabízí vazba na mikrotubuly či disrupce proteinů důležitých pro správné sestavení centrozomů. Ve studii Yang et al., 2020 obsahovaly myší oocyty vystavené BPA *in vitro* výrazně kratší vřetenové struktury s vysoce nezaostřenými póly vřeténka a narušenou organizací pericentrinu. Data z této studie naznačují, že BPA narušuje u myších oocytů shlukování pericentrinu na pólech meiotického vřeténka, což může narušit integritu a funkci acentriolárního MTOC. V této studii také BPA snižovalo stabilitu mikrotubulů, narušovalo regulaci mikrotubulové polymerace/depolymerizace, a tím narušovalo organizaci DV. BPA narušovalo distribuci pericentrinu v oocytech během meiotického zrání i ve studii Can et al., 2005, mikrotubul jako cílový protein působení BPA potvrdila i studie George et al., 2008. Nedávná studie na somatických buňkách také potvrdila, že BPA narušuje připojení vřetene ke kinetochorám aktivací SAC (Kim et al., 2019). Námi pozorované obdobné defekty DV v případě expozice PF201 naznačují, že PF201 pravděpodobně využívá stejné molekulární mechanismy jako výše zmíněné ED.

Třetím experimentem této práce bylo sledování vlivu PF201 na epigenetické markery histonů H3K4, H3K9 a jejich metylace – H3K4me2, kde koncovka označuje dimetylaci na 4. lyzinovém zbytku histonu H3 a H3K9me3, kde koncovka označuje trimetylaci na 9. lyzinovém zbytku téhož histonu. V tomto experimentu byla vyjádřena úroveň metylace histonů relativní intenzitou fluorescence jako střední hodnota označené plochy pomocí softwaru ImageJ. V případě histonu H3K4me2 došlo vlivem PF201 ke statisticky významnému zvýšení relativní intenzity

fluorescence u skupin 300 pM a 3 μ M, naopak míra relativní intenzity fluorescence u skupiny ošetřené 30 nM koncentrací PF201 zůstala na úrovni kontroly. V případě H3K9me3 došlo k signifikantnímu zvýšení relativní intenzity fluorescence u skupin 30 nM a 3 μ M oproti kontrole, další statistické závislosti jsou vyjádřeny v grafu č. 4.

Dosud se žádná studie nevěnovala vlivu pergafastu 201 na metylaci DNA či histonové modifikace, nabízí se ale srovnání s BPA, kde ve studiích pozorovaly výzkumné skupiny námi sledované histony.

Ve studii Trapphoff et al., 2013 analýza potvrdila, že relativní fluorescence pro H3K9me3 byla vlivem BPA statisticky významně nižší ve srovnání s kontrolní skupinou. Na myších oocytech zde byla pozorována souvislost mezi expozicí BPA a indukci epigenetických změn, které mohou přispívat k selhání rozchodu chromozomů a ke změně genové exprese, jež může ovlivnit zdraví potomků. Změna metylace H3K9me3 by mohla ovlivnit nábor *de novo* metylačních komplexů a stav heterochromatinu v dalším vývoji, jelikož např. potlačení exprese genu udržujícího pluripotenci v embryonálních kmenových buňkách je řízeno metylací H3K9 (Feldman et al., 2006; Tomizawa et al., 2012).

Epigenetické změny v prasečích oocytech pozorovala skupina Wang et al., 2016. Snížená hladina H3K4me2 a změna metylace DNA zde indikovala ovlivnění epigenetických modifikací po expozici BPA. Jelikož je di-metylce H3K4 spojována s aktivací transkripce, v případě myší byla snížená úroveň metylace H3K4me2 spojována s ovlivněním *de novo* metylace imprintovaných genů, aktivace embryonálního genomu, fertility či fyziologického embryonálního vývoje (Ancelin et al., 2016; Ciccone et al., 2009; Kim et al., 2015). V souvislosti s BPA, BPS a námi pozorovaným zvýšením relativní intenzity fluorescence u zmíněných histonů v oocytech jsem v dostupných publikacích nenašla shodu. Objasnění působení PF201 na epigenetické modifikace je proto nutné podpořit dalšími studiemi.

Poslední výsledek naší práce se týká kvantifikace relativní exprese mRNA EsR α a EsR β v oocytech ošetřených 30nM a 3 μ M koncentracemi PF201 po kultivaci *in vitro*. Vzhledem k tomu, že se jedná o nekompletní výsledky, byla pro srovnání použita pouze deskriptivní statistika. Uvedené výsledky je nutné považovat za předběžné a explorativní. U skupiny ošetřené 30 nM koncentrací PF201 jsme pozorovali sníženou relativní expresi EsR α mRNA oproti kontrole a oproti kontrole zvýšenou relativní expresi EsR α mRNA u skupiny ošetřené 3 μ M koncentrací PF201. V případě

EsR β jsme pozorovali sníženou relativní expresi EsR β mRNA ve srovnání s kontrolou u obou pozorovaných skupin (30 nM a 3 μ M). Rozdílné účinky PF201 na transkripty EsR α a EsR β mohou souviset s případnou rozdílnou afinitou PF201 k enzymům účastnícím se steroidogeneze či metabolismu, jelikož estrogení aktivita k několika vybraným proteinům u PF201 nebyla potvrzena (Goldinger et al., 2015; US EPA, 2014). Jelikož je oocyt během meiotického zrání transkripčně neaktivní, snížená exprese mRNA EsR může být způsobena destabilizací těchto mRNA či jejich selektivní degradací (Su et al., 2007). Pozorované zvýšení exprese mRNA pro EsR β by mohlo naopak být způsobeno absencí těchto signalizací. U BPA i BPS byl potvrzen negativní vliv na expresi transkriptů EsR α a EsR β . V případě BPA byla u exponované skupiny pozorována nadměrná exprese EsR α ve studii Chao et al., 2012 u myších oocytů, kde ovšem nebyl potvrzen vliv na změnu exprese mRNA pro ER β . Ve studii Brieno-Enriquez et al., 2012 prováděné na oocytech lidských plodů BPA ovlivňoval expresi ER β . Ve studii Žalmanová et al., 2017 po kultivaci prasečích oocytů *in vitro* s BPS nebyly v oocytech detekovatelné transkripty mRNA pro ER α , což částečně koresponduje s našimi předběžnými výsledky i v případě použití 30nM koncentrace PF201. V případě 3 μ M expozice je předběžný výsledek odlišný. Nicméně, naše dosažené výsledky nejsou kompletní, proto nelze vyvozovat konečné závěry.

9. Závěr

V této diplomové práci jsme testovali hypotézu negativního vlivu PF201 na průběh meiotického zrání prasečích oocytů *in vitro*.

- Na základě výsledků prvního experimentu jsme potvrdili negativní vliv pergafastu 201 na průchod prasečího oocyty meiotickým zráním. V experimentu byl naměřen signifikantní rozdíl ve schopnosti dosáhnout stádia druhé meiotické metafáze u oocytů ošetřených 30 nM koncentrací PF201.
- Ve druhém experimentu byl potvrzen negativní vliv PF201 na utváření DV v průběhu meiotického zrání. Signifikantně vyšší počet abnormálních vřetének byl zjištěn u skupin oocytů ošetřených 300 pM a 30 nM koncentrací PF201.
- Data třetího experimentu prokázala vliv PF201 na epigenetické markery histony H3K4me2 a H3K9me3. Expozice 300 pM a 3 μ M koncentracemi PF201 způsobila významně zvýšenou relativní intenzitu fluorescence H3K4me2 oproti kontrole, u H3K9me3 data ukazují zvýšenou relativní intenzitu fluorescence u skupin exponovaných 30 nM a 3 μ M koncentracemi PF201 oproti kontrolní skupině.
- Na závěr jsme v předběžných výsledcích pozorovali vliv PF201 na expresi mRNA pro EsR α a EsR β . U skupiny ošetřené 30 nM koncentrací PF201 jsme pozorovali sníženou relativní expresi EsR α mRNA oproti kontrole a oproti kontrole zvýšenou relativní expresi EsR α mRNA u skupiny ošetřené 3 μ M koncentrací PF201. U EsR β jsme pozorovali sníženou relativní expresi EsR β mRNA ve srovnání s kontrolou u obou pozorovaných skupin (30 nM a 3 μ M).

10. Citovaná literatura

- Ahmad, S. A., Sayed, M. H., Barua, S., Khan, M. H., Faruquee, M. H., Jalil, A., Hadi, S. A., & Talukder, H. K. (2001). Arsenic in drinking water and pregnancy outcomes. *Environmental Health Perspectives*, 109(6), 629–631. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109629>
- Ai, J.-S., Li, M., Schatten, H., & Sun, Q.-Y. (2009). Regulatory Mechanism of Spindle Movements during Oocyte Meiotic Division. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(11), 1477–1486. <https://doi.org/10.5713/ajas.2009.r.12>
- Almouzni, G., & Probst, A. V. (2011). Heterochromatin maintenance and establishment: Lessons from the mouse pericentromere. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 2(5), 332–338. <https://doi.org/10.4161/nucl.2.5.17707>
- Amar, S., Binet, A., Tétéau, O., Desmarchais, A., Papillier, P., Lacroix, M. Z., Maillard, V., Guérif, F., & Elis, S. (2020). Bisphenol S Impaired Human Granulosa Cell Steroidogenesis in Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1821. <https://doi.org/10.3390/ijms21051821>
- Amaya, E., Gil, F., Freire, C., Olmedo, P., Fernández-Rodríguez, M., Fernández, M. F., & Olea, N. (2013). Placental concentrations of heavy metals in a mother–child cohort. *Environmental Research*, 120, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2012.09.009>
- Amir, S., Shah, S. T. A., Mamoulakis, C., Docea, A. O., Kalantzi, O.-I., Zachariou, A., Calina, D., Carvalho, F., Sofikitis, N., Makrigiannakis, A., & Tsatsakis, A. (2021). Endocrine Disruptors Acting on Estrogen and Androgen Pathways Cause Reproductive Disorders through Multiple Mechanisms: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(4), 1464. <https://doi.org/10.3390/ijerph18041464>
- Ancelin, K., Syx, L., Borensztein, M., Ranisavljevic, N., Vassilev, I., Briseño-Roa, L., Liu, T., Metzger, E., Servant, N., Barillot, E., Chen, C.-J., Schüle, R., & Heard, E. (2016). Maternal LSD1/KDM1A is an essential regulator of chromatin and transcription landscapes during zygotic genome activation. *ELife*, 5, e08851. <https://doi.org/10.7554/eLife.08851>
- Araki, K., Naito, K., Haraguchi, S., Suzuki, R., Yokoyama, M., Inoue, M., Aizawa, S., Toyoda, Y., & Sato, E. (1996). Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: Activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biology of Reproduction*, 55(6), 1315–1324. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.6.1315>
- Baca, M., & Zamboni, L. (1967). The fine structure of human follicular oocytes. *Journal of Ultrastructure Research*, 19(3–4), 354–381. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(67\)80225-9](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(67)80225-9)
- Bachvarova, R. (1985). Gene expression during oogenesis and oocyte development in mammals. *Developmental Biology (New York, N.Y.: 1985)*, 1, 453–524. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6814-8_11
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., & Kouzarides, T.

- (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 410(6824), 120–124. <https://doi.org/10.1038/35065138>
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., & Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4), 823–837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>
- Bastos, A. M. X., Souza, M. do C. B. de, Almeida Filho, G. L. de, Krauss, T. M., Pavesi, T., & Silva, L. E. da. (2013). Organochlorine compound levels in fertile and infertile women from Rio de Janeiro, Brazil. *Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia*, 57(5), 346–353. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302013000500003>
- Baxter, J. D., Rousseau, G. G., Benson, M. C., Garcea, R. L., Ito, J., & Tomkins, G. M. (1972). Role of DNA and Specific Cytoplasmic Receptors in Glucocorticoid Action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(7), 1892–1896.
- Bernard, P., Maure, J. F., & Javerzat, J. P. (2001). Fission yeast Bub1 is essential in setting up the meiotic pattern of chromosome segregation. *Nature Cell Biology*, 3(5), 522–526. <https://doi.org/10.1038/35074598>
- Berridge, M. J., & Irvine, R. F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312(5992), 315–321. <https://doi.org/10.1038/312315a0>
- Berridge, M. J., & Irvine, R. F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, 341(6239), Art. 6239. <https://doi.org/10.1038/341197a0>
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>
- Biedermann, S., Tschudin, P., & Grob, K. (2010). Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(1), 571–576. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3936-9>
- Björnsdotter, M. K., Jonker, W., Legradi, J., Kool, J., & Ballesteros-Gómez, A. (2017). Bisphenol A alternatives in thermal paper from the Netherlands, Spain, Sweden and Norway. Screening and potential toxicity. *Science of The Total Environment*, 601–602, 210–221. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.171>
- Bleil, J. D., & Wassarman, P. M. (1980). Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Developmental Biology*, 76(1), 185–202. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(80\)90371-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(80)90371-1)
- Bornslaeger, E. A., Mattei, P., & Schultz, R. M. (1986). Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Developmental Biology*, 114(2), 453–462. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(86\)90209-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(86)90209-5)
- Bornslaeger, E. A., Wilde, M. W., & Schultz, R. M. (1984). Regulation of mouse oocyte maturation: Involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmodulin. *Developmental Biology*, 105(2), 488–499.

[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(84\)90306-3](https://doi.org/10.1016/0012-1606(84)90306-3)

- Bouftas, N., & Wassmann, K. (2019). Cycling through mammalian meiosis: B-type cyclins in oocytes. *Cell Cycle*, 18(14), 1537–1548. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1632139>
- Bowman, G. D., & Poirier, M. G. (2015). Post-translational modifications of histones that influence nucleosome dynamics. *Chemical Reviews*, 115(6), 2274–2295. <https://doi.org/10.1021/cr500350x>
- Brehove, M., Wang, T., North, J., Luo, Y., Dreher, S. J., Shimko, J. C., Ottesen, J. J., Luger, K., & Poirier, M. G. (2015). Histone core phosphorylation regulates DNA accessibility. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(37), 22612–22621. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.661363>
- Brieno-Enriquez, M. A., Reig-Viader, R., Cabero, L., Toran, N., Martinez, F., Roig, I., & Garcia Caldes, M. (2012). Gene expression is altered after bisphenol A exposure in human fetal oocytes in vitro. *Molecular Human Reproduction*, 18(4), 171–183. <https://doi.org/10.1093/molehr/gar074>
- Briño-Enríquez, M. A., Robles, P., Camats-Tarruella, N., García-Cruz, R., Roig, I., Cabero, L., Martínez, F., & Caldés, M. G. (2011). Human meiotic progression and recombination are affected by Bisphenol A exposure during in vitro human oocyte development. *Human Reproduction*, 26(10), 2807–2818. <https://doi.org/10.1093/humrep/der249>
- Calafat, A. M., Kuklenyik, Z., Reidy, J. A., Caudill, S. P., Ekong, J., & Needham, L. L. (2005). Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environmental Health Perspectives*, 113(4), 391–395. <https://doi.org/10.1289/ehp.7534>
- Can, A., Semiz, O., & Cinar, O. (2005). Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. *Molecular Human Reproduction*, 11(6), 389–396. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah179>
- Ciccone, D. N., Su, H., Hevi, S., Gay, F., Lei, H., Bajko, J., Xu, G., Li, E., & Chen, T. (2009). KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature*, 461(7262), 415–418. <https://doi.org/10.1038/nature08315>
- Clapper, D. L., Walseth, T. F., Dargie, P. J., & Lee, H. C. (1987). Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(20), 9561–9568.
- Clark, J. M., & Eddy, E. M. (1975). Fine structural observations on the origin and associations of primordial germ cells of the mouse. *Developmental Biology*, 47(1), 136–155. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90269-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90269-9)
- Colledge, W. H., Carlton, M. B., Udy, G. B., & Evans, M. J. (1994). Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature*, 370(6484), 65–68. <https://doi.org/10.1038/370065a0>
- Compton, D. A., & Luo, C. (1995). Mutation of the predicted p34cdc2 phosphorylation sites in NuMA impair the assembly of the mitotic spindle and block mitosis. *Journal of Cell Science*, 108 (Pt 2), 621–633.

<https://doi.org/10.1242/jcs.108.2.621>

- Conti, M., Andersen, C. B., Richard, F., Mehats, C., Chun, S. Y., Horner, K., Jin, C., & Tsafiriri, A. (2002). Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1–2), 153–159. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(01\)00686-4](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00686-4)
- Cran, D. G. (1985). Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *Reproduction*, 74(1), 237–245. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0740237>
- Cunha-Ferreira, I., Bento, I., & Bettencourt-Dias, M. (2009). From Zero to Many: Control of Centriole Number in Development and Disease. *Traffic*, 10(5), 482–498. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00905.x>
- Damstra, T., Barlow, S., Bergman, A., & Kavlock, R. (2002). *GLOBAL ASSESSMENT OF THE STATE-OF-THE-SCIENCE OF ENDOCRINE DISRUPTORS*. 190.
- De Felici, M. (2000). Regulation of primordial germ cell development in the mouse. *The International Journal of Developmental Biology*, 44(6), 575–580.
- De La Fuente, R., Viveiros, M. M., Burns, K. H., Adashi, E. Y., Matzuk, M. M., & Eppig, J. J. (2004). Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. *Developmental Biology*, 275(2), 447–458. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.028>
- Dekel, N., Galiani, D., & Sherizly, I. (1988). Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 56(1), 115–121. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(88\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0303-7207(88)90015-9)
- Desmarchais, A., Têteau, O., Papillier, P., Jaubert, M., Druart, X., Binet, A., Maillard, V., & Elis, S. (2020). Bisphenol S Impaired In Vitro Ovine Early Developmental Oocyte Competence. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1238. <https://doi.org/10.3390/ijms21041238>
- de Sousa Lopes, S. M. C., Hayashi, K., & Surani, M. A. (2007). Proximal visceral endoderm and extraembryonic ectoderm regulate the formation of primordial germ cell precursors. *BMC Developmental Biology*, 7, 140. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-140>
- Dicthenberg, J. B., Zimmerman, W., Sparks, C. A., Young, A., Vidair, C., Zheng, Y., Carrington, W., Fay, F. S., & Doxsey, S. J. (1998). Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *The Journal of Cell Biology*, 141(1), 163–174. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.1.163>
- Doshi, T., Mehta, S. S., Dighe, V., Balasiner, N., & Vanage, G. (2011). Hypermethylation of estrogen receptor promoter region in adult testis of rats exposed neonatally to bisphenol A. *Toxicology*, 289(2–3), 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.07.011>
- Doxsey, S. J., Stein, P., Evans, L., Calarco, P. D., & Kirschner, M. (1994). Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. *Cell*, 76(4), 639–650.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90504-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90504-5)

- Ducibella, T., Ukena, T., Karnovsky, M., & Anderson, E. (1977). Changes in cell surface and cortical cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse embryo. *The Journal of Cell Biology*, 74(1), 153–167. <https://doi.org/10.1083/jcb.74.1.153>
- Dumasia, K., Kumar, A., Deshpande, S., & Balasinor, N. H. (2017). Estrogen signaling, through estrogen receptor β , regulates DNA methylation and its machinery in male germ line in adult rats. *Epigenetics*, 12(6), 476–483. <https://doi.org/10.1080/15592294.2017.1309489>
- Duty, S. M., Singh, N. P., Silva, M. J., Barr, D. B., Brock, J. W., Ryan, L., Herrick, R. F., Christiani, D. C., & Hauser, R. (2003). The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. *Environmental Health Perspectives*, 111(9), 1164–1169. <https://doi.org/10.1289/ehp.5756>
- Dyce, P. W., & Li, J. (2006). From skin cells to ovarian follicles? *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(13), 1371–1375. <https://doi.org/10.4161/cc.5.13.2898>
- Eckardt, M., Kubicova, M., Tong, D., & Simat, T. J. (2020). Determination of color developers replacing bisphenol A in thermal paper receipts using diode array and Corona charged aerosol detection—A German market analysis 2018/2019. *Journal of Chromatography A*, 1609, 460437. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460437>
- Eckardt, M., & Simat, T. J. (2017). Bisphenol A and alternatives in thermal paper receipts—A German market analysis from 2015 to 2017. *Chemosphere*, 186, 1016–1025. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.037>
- Ehrlich, M. (2003). Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88(5), 899–910. <https://doi.org/10.1002/jcb.10464>
- Eichenlaub-Ritter, U., Vogt, E., Cukurcam, S., Sun, F., Pacchierotti, F., & Parry, J. (2008). Exposure of mouse oocytes to bisphenol A causes meiotic arrest but not aneuploidy. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 651(1–2), 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.10.014>
- Eppig, J. J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction (Cambridge, England)*, 122(6), 829–838. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220829>
- Eppig, J. J., O'Brien, M., & Wigglesworth, K. (1996). Mammalian oocyte growth and development in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 44(2), 260–273. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199606\)44:2<260::AID-MRD17>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199606)44:2<260::AID-MRD17>3.0.CO;2-6)
- Eppig, J. J., Viveiros, M. M., Bivens, C. M., & De La Fuente, R. (2004). Regulation of Mammalian Oocyte Maturation. In *The Ovary* (s. 113–129). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012444562-8/50008-2>
- European Commission. (1996). *European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife*. Environment and climate research programme DX. <http://www.iehconsulting.co.uk>

- European Union. (2016). *Commission Regulation (EU) 2016/2235 of 12 December 2016 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards bisphenol A*. <http://data.europa.eu/eli/reg/2016/2235/oj/eng>
- Fahiminiya, S., & Gérard, N. (2010). [Follicular fluid in mammals]. *Gynecologie, Obstetrique & Fertilité*, 38(6), 402–404. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2010.04.010>
- Fang, H., Tong, W., Branham, W. S., Moland, C. L., Dial, S. L., Hong, H., Xie, Q., Perkins, R., Owens, W., & Sheehan, D. M. (2003). Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chemical Research in Toxicology*, 16(10), 1338–1358. <https://doi.org/10.1021/tx030011g>
- Fattaey, A., & Booher, R. N. (1997). Myt1: A Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. *Progress in Cell Cycle Research*, 3, 233–240. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5371-7_18
- Faulk, C., Kim, J. H., Jones, T. R., McEachin, R. C., Nahar, M. S., Dolinoy, D. C., & Sartor, M. A. (2015). Bisphenol A-associated alterations in genome-wide DNA methylation and gene expression patterns reveal sequence-dependent and non-monotonic effects in human fetal liver. *Environmental Epigenetics*, 1(1), dvv006. <https://doi.org/10.1093/eep/dvv006>
- Favreau, C., Worman, H. J., Wozniak, R. W., Frappier, T., & Courvalin, J. C. (1996). Cell cycle-dependent phosphorylation of nucleoporins and nuclear pore membrane protein Gp210. *Biochemistry*, 35(24), 8035–8044. <https://doi.org/10.1021/bi9600660>
- Feldman, N., Gerson, A., Fang, J., Li, E., Zhang, Y., Shinkai, Y., Cedar, H., & Bergman, Y. (2006). G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nature Cell Biology*, 8(2), 188–194. <https://doi.org/10.1038/ncb1353>
- Freudzon, L., Norris, R. P., Hand, A. R., Tanaka, S., Saeki, Y., Jones, T. L. Z., Rasenick, M. M., Berlot, C. H., Mehlmann, L. M., & Jaffe, L. A. (2005). Regulation of meiotic prophase arrest in mouse oocytes by GPR3, a constitutive activator of the Gs G protein. *The Journal of Cell Biology*, 171(2), 255–265. <https://doi.org/10.1083/jcb.200506194>
- Fukuda, A., Tomikawa, J., Miura, T., Hata, K., Nakabayashi, K., Eggan, K., Akutsu, H., & Umezawa, A. (2014). The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice. *Nature Communications*, 5, 5464. <https://doi.org/10.1038/ncomms6464>
- García-Cao, M., O'Sullivan, R., Peters, A. H. F. M., Jenuwein, T., & Blasco, M. A. (2004). Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nature Genetics*, 36(1), 94–99. <https://doi.org/10.1038/ng1278>
- Gardner, R. L. (1978). The relationship between cell lineage and differentiation in the early mouse embryo.

- Results and Problems in Cell Differentiation*, 9, 205–241. https://doi.org/10.1007/978-3-540-35803-9_8
- George, O., Bryant, B. K., Chinnasamy, R., Corona, C., Arterburn, J. B., & Shuster, C. B. (2008). Bisphenol A directly targets tubulin to disrupt spindle organization in embryonic and somatic cells. *ACS chemical biology*, 3(3), 10.1021/cb700210u. <https://doi.org/10.1021/cb700210u>
- Ginsburg, M., Snow, M. H., & McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development (Cambridge, England)*, 110(2), 521–528.
- Gittens, J. E. I., & Kidder, G. M. (2005). Differential contributions of connexin37 and connexin43 to oogenesis revealed in chimeric reaggregated mouse ovaries. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 21), 5071–5078. <https://doi.org/10.1242/jcs.02624>
- Gittens, J. E. I., Mhawi, A. A., Lidington, D., Ouellette, Y., & Kidder, G. M. (2003). Functional analysis of gap junctions in ovarian granulosa cells: Distinct role for connexin43 in early stages of folliculogenesis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 284(4), C880–887. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00277.2002>
- Goldinger, D. M., Demierre, A.-L., Zoller, O., Rupp, H., Reinhard, H., Magnin, R., Becker, T. W., & Bourqui-Pittet, M. (2015). Endocrine activity of alternatives to BPA found in thermal paper in Switzerland. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 71(3), 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.01.002>
- Gondos, B., Bhiraleus, P., & Hobel, C. J. (1971). Ultrastructural observations on germ cells in human fetal ovaries. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 110(5), 644–652. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(71\)90245-6](https://doi.org/10.1016/0002-9378(71)90245-6)
- Gordo, A. C., He, C. L., Smith, S., & Fissore, R. A. (2001). Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 59(1), 106–114. <https://doi.org/10.1002/mrd.1012>
- Gosden, R., Krapez, J., & Briggs, D. (1997). Growth and development of the mammalian oocyte. *BioEssays*, 19(10), 875–882. <https://doi.org/10.1002/bies.950191007>
- Granot, I., & Dekel, N. (1994). Phosphorylation and expression of connexin-43 ovarian gap junction protein are regulated by luteinizing hormone. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(48), 30502–30509.
- Green, M. P., Harvey, A. J., Finger, B. J., & Tarulli, G. A. (2021). Endocrine disrupting chemicals: Impacts on human fertility and fecundity during the peri-conception period. *Environmental Research*, 194, 110694. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110694>
- Greenfield, M. L. (1966). The oocyte of the domestic chicken shortly after hatching, studied by electron microscopy. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 15(3), 297–316.
- Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K., & Pines, J. (1999). Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Current Biology: CB*, 9(13), 680–689.

- [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(99\)80308-x](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(99)80308-x)
- Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J., & Surani, M. A. (2002). Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mechanisms of Development*, 117(1–2), 15–23.
[https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(02\)00181-8](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(02)00181-8)
- Hammes, S. R., & Levin, E. R. (2007). Extranuclear Steroid Receptors: Nature and Actions. *Endocrine Reviews*, 28(7), 726–741. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0022>
- Han, S. J., & Conti, M. (2006). New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(3), 227–231.
<https://doi.org/10.4161/cc.5.3.2395>
- Han, S. J., Chen, R., Paronetto, M. P., & Conti, M. (2005). Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. *Current Biology: CB*, 15(18), 1670–1676.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.056>
- Hansen, D. V., Tung, J. J., & Jackson, P. K. (2006). CaMKII and polo-like kinase 1 sequentially phosphorylate the cytostatic factor Emi2/XErp1 to trigger its destruction and meiotic exit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 608–613.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0509549102>
- Harlow, C. R., Davidson, L., Burns, K. H., Yan, C., Matzuk, M. M., & Hillier, S. G. (2002). FSH and TGF-beta superfamily members regulate granulosa cell connective tissue growth factor gene expression in vitro and in vivo. *Endocrinology*, 143(9), 3316–3325. <https://doi.org/10.1210/en.2001-211389>
- Hashimoto, N., Watanabe, N., Furuta, Y., Tamemoto, H., Sagata, N., Yokoyama, M., Okazaki, K., Nagayoshi, M., Takeda, N., & Ikawa, Y. (1994). Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. *Nature*, 370(6484), 68–71. <https://doi.org/10.1038/370068a0>
- Hauser, R., Meeker, J. D., Duty, S., Silva, M. J., & Calafat, A. M. (2006). Altered semen quality in relation to urinary concentrations of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 17(6), 682–691. <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000235996.89953.d7>
- Herbert, M., Levasseur, M., Homer, H., Yallop, K., Murdoch, A., & McDougall, A. (2003). Homologue disjunction in mouse oocytes requires proteolysis of securin and cyclin B1. *Nature Cell Biology*, 5(11), 1023–1025.
<https://doi.org/10.1038/ncb1062>
- Hillier, S. G., Whitelaw, P. F., & Smyth, C. D. (1994). Follicular oestrogen synthesis: The „two-cell, two-gonadotrophin" model revisited. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 100(1–2), 51–54.
[https://doi.org/10.1016/0303-7207\(94\)90278-x](https://doi.org/10.1016/0303-7207(94)90278-x)
- Holt, J. E., & Jones, K. T. (2009). Control of homologous chromosome division in the mammalian oocyte. *Molecular Human Reproduction*, 15(3), 139–147. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap007>
- Holubcová, Z., Blayney, M., Elder, K., & Schuh, M. (2015). Human oocytes. Error-prone chromosome-mediated

- spindle assembly favors chromosome segregation defects in human oocytes. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6239), 1143–1147. <https://doi.org/10.1126/science.aaa9529>
- Horner, K., Livera, G., Hinckley, M., Trinh, K., Storm, D., & Conti, M. (2003). Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Developmental Biology*, 258(2), 385–396. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00134-9](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00134-9)
- Hunt, T. (1989). Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Current Opinion in Cell Biology*, 1(2), 268–274. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(89\)90099-9](https://doi.org/10.1016/0955-0674(89)90099-9)
- Hunter, M. (2000). Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*, 5(2), 122–130. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0050122>
- Hunter, & Polge, C. (1966). MATURATION OF FOLLICULAR OOCYTES IN THE PIG AFTER INJECTION OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPHIN. *Reproduction*, 12(3), 525–531. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0120525>
- Hyldig, S. M. W., Croxall, N., Contreras, D. A., Thomsen, P. D., & Alberio, R. (2011). Epigenetic reprogramming in the porcine germ line. *BMC Developmental Biology*, 11, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-11-11>
- Chang, S.-H., Cheng, B.-H., Lee, S.-L., Chuang, H.-Y., Yang, C.-Y., Sung, F.-C., & Wu, T.-N. (2006). Low blood lead concentration in association with infertility in women. *Environmental Research*, 101(3), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.10.004>
- Chao, H.-H., Zhang, X.-F., Chen, B., Pan, B., Zhang, L.-J., Li, L., Sun, X.-F., Shi, Q.-H., & Shen, W. (2012). Bisphenol A exposure modifies methylation of imprinted genes in mouse oocytes via the estrogen receptor signaling pathway. *Histochemistry and Cell Biology*, 137(2), 249–259. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0894-z>
- Chen, D., Cho, S. I., Chen, C., Wang, X., Damokosh, A. I., Ryan, L., Smith, T. J., Christiani, D. C., & Xu, X. (2000). Exposure to benzene, occupational stress, and reduced birth weight. *Occupational and Environmental Medicine*, 57(10), 661–667. <https://doi.org/10.1136/oem.57.10.661>
- Cho, W. K., Stern, S., & Biggers, J. D. (1974). Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *Journal of Experimental Zoology*, 187(3), 383–386. <https://doi.org/10.1002/jez.1401870307>
- Choi, T., Fukasawa, K., Zhou, R., Tessarollo, L., Borror, K., Resau, J., & Vande Woude, G. F. (1996). The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(14), 7032–7035. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.14.7032>
- Choy, C. M. Y., Lam, C. W. K., Cheung, L. T. F., Briton-Jones, C. M., Cheung, L. P., & Haines, C. J. (2002). Infertility, blood mercury concentrations and dietary seafood consumption: A case-control study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 109(10), 1121–1125. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2002.02084.x>

- Chuma, S., & Nakatsuji, N. (2001). Autonomous transition into meiosis of mouse fetal germ cells in vitro and its inhibition by gp130-mediated signaling. *Developmental Biology*, 229(2), 468–479.
<https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9989>
- Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y., & Taketani, Y. (2002). Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 17(11), 2839–2841. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.11.2839>
- Inoue, M., Naito, K., Aoki, F., Toyoda, Y., & Sato, E. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote (Cambridge, England)*, 3(3), 265–271.
<https://doi.org/10.1017/s0967199400002665>
- Jamnongjit, M., Gill, A., & Hammes, S. R. (2005). Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(45), 16257–16262. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508521102>
- Jarrell, V. L., Day, B. N., & Prather, R. S. (1991). The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, *Sus scrofa*: Quantitative and qualitative aspects of protein synthesis. *Biology of Reproduction*, 44(1), 62–68. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.1.62>
- Job, D., Valiron, O., & Oakley, B. (2003). Microtubule nucleation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(1), 111–117.
[https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(02\)00003-0](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(02)00003-0)
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., & Tilly, J. L. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 428(6979), 145–150. <https://doi.org/10.1038/nature02316>
- Jones, K. T. (2005). Mammalian egg activation: From Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction (Cambridge, England)*, 130(6), 813–823. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00710>
- Jones, K. T., Matsuda, M., Parrington, J., Katan, M., & Swann, K. (2000). Different Ca²⁺-releasing abilities of sperm extracts compared with tissue extracts and phospholipase C isoforms in sea urchin egg homogenate and mouse eggs. *Biochemical Journal*, 346(Pt 3), 743–749.
- Jukam, D., Shariati, S. A. M., & Skotheim, J. M. (2017). Zygotic genome activation in vertebrates. *Developmental cell*, 42(4), 316–332. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.07.026>
- Kanitz, W., Brüssow, K.-P., Becker, F., Torner, H., & Tomek, W. (2001). Comparative Aspects of Follicular Development, Follicular and Oocyte Maturation and Ovulation in Cattle and Pigs. *Arch. Tierz. Dummerstorf*, 44, 9–23.
- Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomeli, H., Nagy, A., McLaughlin, K. J., Schöler, H. R., & Tomilin, A. (2004). Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Reports*, 5(11), 1078–1083. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400279>
- Kim, Gwon, D., Kim, J. A., Choi, H., & Jang, C.-Y. (2019). Bisphenol A disrupts mitotic progression via disturbing spindle attachment to kinetochore and centriole duplication in cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*, 59,

- 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.04.009>
- Kim, J., Singh, A. K., Takata, Y., Lin, K., Shen, J., Lu, Y., Kerenyi, M. A., Orkin, S. H., & Chen, T. (2015). LSD1 is essential for oocyte meiotic progression by regulating CDC25B expression in mice. *Nature Communications*, 6, 10116. <https://doi.org/10.1038/ncomms10116>
- Kishimoto, T. (2003). Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6), 654–663. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.010>
- Knobil, E. (1974). On the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Recent Progress in Hormone Research*, 30(0), 1–46. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-571130-2.50005-5>
- Knobil, E. (1980). The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Progress in Hormone Research*, 36, 53–88. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-571136-4.50008-5>
- Kobayashi, T., Zhang, H., Tang, W. W. C., Irie, N., Withey, S., Klisch, D., Sybirna, A., Dietmann, S., Contreras, D. A., Webb, R., Allegrucci, C., Alberio, R., & Surani, M. A. (2017). Principles of early human development and germ cell program from conserved model systems. *Nature*, 546(7658), 416–420. <https://doi.org/10.1038/nature22812>
- Kol, S., & Adashi, E. Y. (1995). Intraovarian factors regulating ovarian function. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 7(3), 209–213. <https://doi.org/10.1097/00001703-199506000-00010>
- Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 184(4139), 868–871. <https://doi.org/10.1126/science.184.4139.868>
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Krsmanović, L. Z., Stojilković, S. S., Mertz, L. M., Tomić, M., & Catt, K. J. (1993). Expression of gonadotropin-releasing hormone receptors and autocrine regulation of neuropeptide release in immortalized hypothalamic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9), 3908–3912. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.3908>
- Kuiper, G. G. J. M., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B., & Gustafsson, J.-Å. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . *Endocrinology*, 139(10), 4252–4263. <https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6216>
- Kuruto-Niwa, R., Nozawa, R., Miyakoshi, T., Shiozawa, T., & Terao, Y. (2005). Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(1), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.05.009>
- Laurent, L., Wong, E., Li, G., Huynh, T., Tsigos, A., Ong, C. T., Low, H. M., Kin Sung, K. W., Rigoutsos, I., Loring, J., & Wei, C.-L. (2010). Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Research*, 20(3), 320–331. <https://doi.org/10.1101/gr.101907.109>
- Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., Davis, A. M., Wright, C. V., Korving, J. P., & Hogan, B.

- L. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes & Development*, 13, 424–436. <https://doi.org/10.1101/gad.13.4.424>
- Lee, Bonneau, A. R., & Giraldez, A. J. (2014). Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 581–613. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013027>
- Lee, Miyano, T., & Moor, R. M. (2000). Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote (Cambridge, England)*, 8(2), 119–125. <https://doi.org/10.1017/s0967199400000897>
- Lehmle, H.-J., Liu, B., Gadogbe, M., & Bao, W. (2018). Exposure to Bisphenol A, Bisphenol F, and Bisphenol S in U.S. Adults and Children: The National Health and Nutrition Examination Survey 2013–2014. *ACS Omega*, 3(6), 6523–6532. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00824>
- Lénárt, P., & Ellenberg, J. (2003). Nuclear envelope dynamics in oocytes: From germinal vesicle breakdown to mitosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(1), 88–95. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00011-X](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00011-X)
- Lenie, S., Cortvriendt, R., Eichenlaub-Ritter, U., & Smits, J. (2008). Continuous exposure to bisphenol A during in vitro follicular development induces meiotic abnormalities. *Mutation Research*, 651(1–2), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.10.017>
- Levine, J. E. (1997). New Concepts of the Neuroendocrine Regulation of Gonadotropin Surges in Rats. *Biology of Reproduction*, 56(2), 293–302. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.2.293>
- Li, B., Carey, M., & Workman, J. L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128(4), 707–719. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>
- Li, & Fan, B. Q. (1997). Changes in the 3-dimensional distribution of mitochondria during meiotic divisions of mouse oocytes. *Theriogenology*, 48(1), 33–41. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00189-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00189-1)
- Li, M., Ai, J.-S., Xu, B.-Z., Xiong, B., Yin, S., Lin, S.-L., Hou, Y., Chen, D.-Y., Schatten, H., & Sun, Q.-Y. (2008). Testosterone potentially triggers meiotic resumption by activation of intra-oocyte SRC and MAPK in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*, 79(5), 897–905. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069245>
- Liao, C., Liu, F., & Kannan, K. (2012). Bisphenol s, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol a residues. *Environmental Science & Technology*, 46(12), 6515–6522. <https://doi.org/10.1021/es300876n>
- Lindbohm, M.-L., Taskinen, H., Sallman, M., & Hemminki, K. (1990). Spontaneous abortions among women exposed to organic solvents. *American Journal of Industrial Medicine*, 17(4), 449–463. <https://doi.org/10.1002/ajim.4700170404>
- Liu, W., Xin, Q., Wang, X., Wang, S., Wang, H., Zhang, W., Yang, Y., Zhang, Y., Zhang, Z., Wang, C., Xu, Y., Duan, E., & Xia, G. (2017). Estrogen receptors in granulosa cells govern meiotic resumption of pre-

- ovulatory oocytes in mammals. *Cell Death & Disease*, 8(3), e2662.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2017.82>
- Lorca, T., Cruzalegui, F. H., Fesquet, D., Cavadore, J. C., Méry, J., Means, A., & Dorée, M. (1993). Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*, 366(6452), 270–273. <https://doi.org/10.1038/366270a0>
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Macaulay, C., Meier, E., & Forbes, D. J. (1995). Differential mitotic phosphorylation of proteins of the nuclear pore complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(1), 254–262.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.1.254>
- Madgwick, S., & Jones, K. T. (2007). How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals Cytostatic Factor. *Cell Division*, 2, 4. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-2-4>
- Magnusson, U. (2005). Can farm animals help to study endocrine disruption? *Domestic Animal Endocrinology*, 29(2), 430–435. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.02.034>
- Magoffin, D. A. (2005). Ovarian theca cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(7), 1344–1349. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.016>
- Machaty, Z., Miller, A. R., & Zhang, L. (2017). Egg Activation at Fertilization. In F. Pelegri, M. Danilchik, & A. Sutherland (Ed.), *Vertebrate Development* (Roč. 953, s. 1–47). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-46095-6_1
- Machtinger, R., Combelles, C. M. H., Missmer, S. A., Correia, K. F., Williams, P., Hauser, R., & Racowsky, C. (2013). Bisphenol-A and human oocyte maturation in vitro. *Human Reproduction*, 28(10), 2735–2745.
<https://doi.org/10.1093/humrep/det312>
- Maller, J. L., Schwab, M. S., Gross, S. D., Taieb, F. E., Roberts, B. T., & Tunquist, B. J. (2002). The mechanism of CSF arrest in vertebrate oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1–2), 173–178.
[https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00695-5](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00695-5)
- Mann, J. S., Lowther, K. M., & Mehlmann, L. M. (2010). Reorganization of the Endoplasmic Reticulum and Development of Ca²⁺ Release Mechanisms During Meiotic Maturation of Human Oocytes¹. *Biology of Reproduction*, 83(4), 578–583. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.085985>
- Marchal, R., Vigneron, C., Perreau, C., Bali-Papp, A., & Mermillod, P. (2002). Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*, 57(5), 1523–1532.
[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00655-6](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00655-6)
- Maro, B., & Verlhac, M.-H. (2002). Polar body formation: New rules for asymmetric divisions. *Nature Cell Biology*, 4(12), E281–E283. <https://doi.org/10.1038/ncb1202-e281>
- Masui, Y. (2001). From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: The history of discoveries of Maturation-

- Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 69(1), 1–17. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2001.690101.x>
- Masui, Y., & Markert, C. L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology*, 177(2), 129–145. <https://doi.org/10.1002/jez.1401770202>
- Matsui, Y., Zsebo, K. M., & Hogan, B. L. (1990). Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature*, 347(6294), 667–669. <https://doi.org/10.1038/347667a0>
- Maurer, H. R., & Chalkley, G. R. (1967). Some properties of a nuclear binding site of estradiol. *Journal of Molecular Biology*, 27(3), 431–441. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(67\)90049-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(67)90049-6)
- McGuinness, B. E., Anger, M., Kouznetsova, A., Gil-Bernabé, A. M., Helmhart, W., Kudo, N. R., Wuensche, A., Taylor, S., Hoog, C., Novak, B., & Nasmyth, K. (2009). Regulation of APC/C Activity in Oocytes by a Bub1-Dependent Spindle Assembly Checkpoint. *Current Biology*, 19(5), 369–380. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.064>
- Mehlmann, L. M. (2005). Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, 130(6), 791–799. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00793>
- Mehlmann, L. M., Jones, T. L. Z., & Jaffe, L. A. (2002). Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5585), 1343–1345. <https://doi.org/10.1126/science.1073978>
- Mehlmann, L. M., Saeki, Y., Tanaka, S., Brennan, T. J., Evsikov, A. V., Pendola, F. L., Knowles, B. B., Eppig, J. J., & Jaffe, L. A. (2004). The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5703), 1947–1950. <https://doi.org/10.1126/science.11103974>
- Mehlmann, L. M., Terasaki, M., Jaffe, L. A., & Kline, D. (1995). Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology*, 170(2), 607–615. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1240>
- Mikoshiba, K., Furuichi, T., Miyawaki, A., Yoshikawa, S., Nakagawa, T., Yamada, N., Hamanaka, Y., Fujino, I., Michikawa, T., & Ryo, Y. (1993). Inositol trisphosphate receptor and Ca²⁺ signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 340(1293), 345–349. <https://doi.org/10.1098/rstb.1993.0077>
- Moller, C. C., & Wassarman, P. M. (1989). Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Developmental Biology*, 132(1), 103–112. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(89\)90209-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(89)90209-1)
- Molyneaux, K. A., Zinszner, H., Kunwar, P. S., Schaible, K., Stebler, J., Sunshine, M. J., O'Brien, W., Raz, E., Littman, D., Wylie, C., & Lehmann, R. (2003). The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4

- regulate mouse germ cell migration and survival. *Development (Cambridge, England)*, 130(18), 4279–4286. <https://doi.org/10.1242/dev.00640>
- Montes-Grajales, D., Morelos-Cortes, X., & Olivero-Verbel, J. (2021). Discovery of New Protein Targets of BPA Analogs and Derivatives Associated with Noncommunicable Diseases: A Virtual High-Throughput Screening. *Environmental Health Perspectives*, 129(3), 37009. <https://doi.org/10.1289/EHP7466>
- Moreno, R. D., Schatten, G., & Ramalho-Santos, J. (2002). Golgi Apparatus Dynamics During Mouse Oocyte In Vitro Maturation: Effect of the Membrane Trafficking Inhibitor Brefeldin A1. *Biology of Reproduction*, 66(5), 1259–1266. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.5.1259>
- Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature*, 374(6518), 131–134. <https://doi.org/10.1038/374131a0>
- Morrison, D. K. (2012). MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11), a011254. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>
- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2017). Pesticides: An update of human exposure and toxicity. *Archives of Toxicology*, 91(2), 549–599. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>
- Motlik, J., Crozet, N., & Fulka, J. (1984). Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, 72(2), 323–328. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0720323>
- Motlik, J., & Fulka, J. (1976). Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *The Journal of Experimental Zoology*, 198(2), 155–162. <https://doi.org/10.1002/jez.1401980205>
- Na, J., & Zernicka-Goetz, M. (2006). Asymmetric positioning and organization of the meiotic spindle of mouse oocytes requires CDC42 function. *Current Biology: CB*, 16(12), 1249–1254. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.05.023>
- Nakajo, N., Yoshitome, S., Iwashita, J., Iida, M., Uto, K., Ueno, S., Okamoto, K., & Sagata, N. (2000). Absence of Wee1 ensures the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *Genes & Development*, 14(3), 328–338.
- Namgoong, S., & Kim, N.-H. (2018). Meiotic spindle formation in mammalian oocytes: Implications for human infertility. *Biology of Reproduction*, 98(2), 153–161. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox145>
- Ndaw, S., Remy, A., Denis, F., Marsan, P., Jargot, D., & Robert, A. (2018). Occupational exposure of cashiers to bisphenol S via thermal paper. *Toxicology Letters*, 298, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.05.026>
- Nebreda, A. R., & Ferby, I. (2000). Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(6), 666–675. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00150-2](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00150-2)
- Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell*, 80(2), 249–257. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90407-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90407-7)
- Nevoral, J., Kolinko, Y., Moravec, J., Žalmanová, T., Hošková, K., Prokešová, Š., Klein, P., Ghaibour, K., Hošek, P., Štiavnická, M., Římnáčová, H., Tonar, Z., Petr, J., & Králíčková, M. (2018). Long-term exposure to

- very low doses of bisphenol S affects female reproduction. *Reproduction (Cambridge, England)*, 156(1), 47–57. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0092>
- Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U. M., Bannister, A. J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R. E., & Kouzarides, T. (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*, 412(6846), 561–565. <https://doi.org/10.1038/35087620>
- Nilsson, I., & Hoffmann, I. (2000). Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Progress in Cell Cycle Research*, 4, 107–114. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4253-7_10
- Nixon, V. L., Levasseur, M., McDougall, A., & Jones, K. T. (2002). Ca(2+) oscillations promote APC/C-dependent cyclin B1 degradation during metaphase arrest and completion of meiosis in fertilizing mouse eggs. *Current Biology: CB*, 12(9), 746–750. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00811-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00811-4)
- 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 (Cambridge, England)*, 136(11), 1869–1878. <https://doi.org/10.1242/dev.035238>
- Nuccitelli, R. (1991). How do sperm activate eggs? *Current Topics in Developmental Biology*, 25, 1–16. [https://doi.org/10.1016/s0070-2153\(08\)60409-3](https://doi.org/10.1016/s0070-2153(08)60409-3)
- Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, 344(6266), 503–508. <https://doi.org/10.1038/344503a0>
- Ohashi, S., Naito, K., Sugiura, K., Iwamori, N., Goto, S., Naruoka, H., & Tojo, H. (2003). Analyses of mitogen-activated protein kinase function in the maturation of porcine oocytes. *Biology of Reproduction*, 68(2), 604–609. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.008334>
- Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S. C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., Saitou, M., & Surani, M. A. (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*, 436(7048), 207–213. <https://doi.org/10.1038/nature03813>
- Palazzo, A. F., Cook, T. A., Alberts, A. S., & Gundersen, G. G. (2001). MDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nature Cell Biology*, 3(8), 723–729. <https://doi.org/10.1038/35087035>
- Palmer, A., Gavin, A. C., & Nebreda, A. R. (1998). A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: P90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *The EMBO Journal*, 17(17), 5037–5047. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.17.5037>
- Pant, N., Kumar, R., Mathur, N., Srivastava, S. P., Saxena, D. K., & Gujrati, V. R. (2007). Chlorinated pesticide concentration in semen of fertile and infertile men and correlation with sperm quality. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(2), 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.07.012>
- Papanicolaou, G. N. (1924). Ovogenesis during sexual maturity as elucidated by experimental methods.

- Experimental Biology and Medicine*, 21(7), 393–396. <https://doi.org/10.3181/00379727-21-199>
- Paronetto, M. P., Giorda, E., Carsetti, R., Rossi, P., Geremia, R., & Sette, C. (2004). Functional interaction between p90Rsk2 and Emi1 contributes to the metaphase arrest of mouse oocytes. *The EMBO Journal*, 23(23), 4649–4659. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600448>
- PARRINGTON, J., JONES, K. T., LAI, F. A., & SWANN, K. (1999). The soluble sperm factor that causes Ca²⁺ release from sea-urchin (*Lytechinus pictus*) egg homogenates also triggers Ca²⁺ oscillations after injection into mouse eggs. *Biochemical Journal*, 341(1), 1–4. <https://doi.org/10.1042/bj3410001>
- Pepling, M. E., & Spradling, A. C. (2001). Mouse Ovarian Germ Cell Cysts Undergo Programmed Breakdown to Form Primordial Follicles. *Developmental Biology*, 234(2), 339–351. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0269>
- Perry, A. C. F., & Verlhac, M.-H. (2008). Second meiotic arrest and exit in frogs and mice. *EMBO Reports*, 9(3), 246–251. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.22>
- Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J. C., & Nigg, E. A. (1990). In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell*, 61(4), 591–602. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90471-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90471-P)
- Petrnewich, M. A., Trimarchi, J. R., Hanlan, A. K. L., Hammer, M.-A., & Baltz, J. M. (2009). Second meiotic spindle integrity requires MEK/MAP kinase activity in mouse eggs. *The Journal of Reproduction and Development*, 55(1), 30–38. <https://doi.org/10.1262/jrd.20096>
- Piccart, M., Parker, L. M., & Pritchard, K. I. (2003). Oestrogen receptor downregulation: An opportunity for extending the window of endocrine therapy in advanced breast cancer. *Annals of Oncology*, 14(7), 1017–1025. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdg290>
- Picton, H., Briggs, D., & Gosden, R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145(1–2), 27–37. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00166-X](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00166-X)
- Pikó, L., & Clegg, K. B. (1982). Quantitative changes in total RNA, total poly(A), and ribosomes in early mouse embryos. *Developmental Biology*, 89(2), 362–378. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(82\)90325-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(82)90325-6)
- Pincus, G., & Enzmann, E. V. (1935). THE COMPARATIVE BEHAVIOR OF MAMMALIAN EGGS IN VIVO AND IN VITRO. *Journal of Experimental Medicine*, 62(5), 665–675. <https://doi.org/10.1084/jem.62.5.665>
- Pollard, T. D., Blanchoin, L., & Mullins, R. D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29, 545–576. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.545>
- Porras-Gómez, T. J., & Moreno-Mendoza, N. (2017). Neo-oogenesis in mammals. *Zygote*, 25(4), 404–422. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000363>
- Ratner, A. (1976). Effects of Follicle Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone upon Cyclic AMP and Cyclic GMP Levels in Rat Ovaries *in Vitro*¹². *Endocrinology*, 99(6), 1496–1500. <https://doi.org/10.1210/endo->

- Reader, K. L., Stanton, J.-A. L., & Juengel, J. L. (2017). The Role of Oocyte Organelles in Determining Developmental Competence. *Biology*, 6(3), 35. <https://doi.org/10.3390/biology6030035>
- Reale, E., Fustinoni, S., Mercadante, R., Polledri, E., & Hopf, N. B. (2020). Simultaneous Quantification of Bisphenol A, Its Glucuronide Metabolite, and Commercial Alternatives by LC-MS/MS for *In Vitro* Skin Absorption Evaluation. *Chemical Research in Toxicology*, 33(9), 2390–2400. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00148>
- Reale, E., Vernez, D., & Hopf, N. B. (2021). Skin Absorption of Bisphenol A and Its Alternatives in Thermal Paper. *Annals of Work Exposures and Health*, 65(2), 206–218. <https://doi.org/10.1093/annweh/wxaa095>
- Reimann, Freed, E., Hsu, J. Y., Kramer, E. R., Peters, J. M., & Jackson, P. K. (2001). Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell*, 105(5), 645–655. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00361-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00361-0)
- Reimann, & Jackson, P. K. (2002). Emi1 is required for cytostatic factor arrest in vertebrate eggs. *Nature*, 416(6883), 850–854. <https://doi.org/10.1038/416850a>
- Rice, C., & McGaughey, R. W. (1981). Effect of testosterone and dibutyl cAMP on the spontaneous maturation of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 62(1), 245–256. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0620245>
- Rim, K.-T. (2017). Reproductive Toxic Chemicals at Work and Efforts to Protect Workers' Health: A Literature Review. *Safety and Health at Work*, 8(2), 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2017.04.003>
- Robinson-Rechavi, M., Escriva Garcia, H., & Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 4), 585–586. <https://doi.org/10.1242/jcs.00247>
- Rodríguez-Varela, C., & Labarta, E. (2020). Clinical Application of Antioxidants to Improve Human Oocyte Mitochondrial Function: A Review. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(12), E1197. <https://doi.org/10.3390/antiox9121197>
- Rochester, J. R., & Bolden, A. L. (2015). Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environmental Health Perspectives*, 123(7), 643–650. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408989>
- Rothbart, S. B., Krajewski, K., Nady, N., Tempel, W., Xue, S., Badeaux, A. I., Barsyte-Lovejoy, D., Martinez, J. Y., Bedford, M. T., Fuchs, S. M., Arrowsmith, C. H., & Strahl, B. D. (2012). Association of UHRF1 with H3K9 methylation directs the maintenance of DNA methylation. *Nature structural & molecular biology*, 19(11), 1155–1160. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2391>
- Runyan, C., Schaible, K., Molyneaux, K., Wang, Z., Levin, L., & Wylie, C. (2006). Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Development (Cambridge, England)*, 133(24), 4861–4869. <https://doi.org/10.1242/dev.02688>

- Sagata, N. (1996). Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: Its mechanisms and biological significance. *Trends in Cell Biology*, 6(1), 22–28. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(96\)81034-8](https://doi.org/10.1016/0962-8924(96)81034-8)
- Sagata, N., Oskarsson, M., Copeland, T., Brumbaugh, J., & Vande Woude, G. F. (1988). Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature*, 335(6190), 519–525. <https://doi.org/10.1038/335519a0>
- Sagata, N., Watanabe, N., Vande Woude, G. F., & Ikawa, Y. (1989). The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature*, 342(6249), 512–518. <https://doi.org/10.1038/342512a0>
- Saitou, M. (2009). Specification of the germ cell lineage in mice. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14, 1068–1087. <https://doi.org/10.2741/3294>
- Sajiki, J., & Yonekubo, J. (2004). Leaching of bisphenol A (BPA) from polycarbonate plastic to water containing amino acids and its degradation by radical oxygen species. *Chemosphere*, 55(6), 861–867. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.11.065>
- Sallmén, M., Lindbohm, M.-L., Kyyrönen, P., Nykyri, E., Anttila, A., Taskinen, H., & Hemminki, K. (1995). Reduced fertility among women exposed to organic solvents. *American Journal of Industrial Medicine*, 27(5), 699–713. <https://doi.org/10.1002/ajim.4700270506>
- Sallmén, M., Neto, M., & Mayan, O. N. (2008). Reduced fertility among shoe manufacturing workers. *Occupational and Environmental Medicine*, 65(8), 518–524. <https://doi.org/10.1136/oem.2007.032839>
- Sánchez, F., & Smits, J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1822(12), 1896–1912. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013>
- Santos, R. R., Schoevers, E. J., & Roelen, B. A. (2014). Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 12, 117. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-117>
- Sasseville, M., Côté, N., Vigneault, C., Guillemette, C., & Richard, F. J. (2007). 3'5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent up-regulation of phosphodiesterase type 3A in porcine cumulus cells. *Endocrinology*, 148(4), 1858–1867. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1257>
- Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K., & Lai, F. A. (2002). PLC zeta: A sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development (Cambridge, England)*, 129(15), 3533–3544. <https://doi.org/10.1242/dev.129.15.3533>
- Sen, A. (2013). Oocyte Maturation A story of arrest and release. *Frontiers in Bioscience*, S5(2), 451–477. <https://doi.org/10.2741/S383>
- Sha, Q.-Q., Zhang, J., & Fan, H.-Y. (2019). A story of birth and death: mRNA translation and clearance at the onset of maternal-to-zygotic transition in mammals†. *Biology of Reproduction*, 101(3), 579–590. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz012>

- Schatten, G. (1994). The Centrosome and Its Mode of Inheritance: The Reduction of the Centrosome during Gametogenesis and Its Restoration during Fertilization. *Developmental Biology*, 165(2), 299–335. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1256>
- Schultz, R. M., Montgomery, R. R., Ward-Bailey, P. F., & Eppig, J. J. (1983). Regulation of oocyte maturation in the mouse: Possible roles of intercellular communication, cAMP, and testosterone. *Developmental Biology*, 95(2), 294–304. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90030-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90030-1)
- Schwab, M. S., Roberts, B. T., Gross, S. D., Tunquist, B. J., Taieb, F. E., Lewellyn, A. L., & Maller, J. L. (2001). Bub1 is activated by the protein kinase p90(Rsk) during *Xenopus* oocyte maturation. *Current Biology: CB*, 11(3), 141–150. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00045-8](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00045-8)
- Simerly, C., Nowak, G., de Lanerolle, P., & Schatten, G. (1998). Differential expression and functions of cortical myosin IIA and IIB isotypes during meiotic maturation, fertilization, and mitosis in mouse oocytes and embryos. *Molecular Biology of the Cell*, 9(9), 2509–2525. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.9.2509>
- Simoncini, T., & Genazzani, A. R. (2003). Non-genomic actions of sex steroid hormones. *European Journal of Endocrinology*, 148(3), 281–292. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1480281>
- Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-LORENCE, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C. R., Michael, M., Mendelson, C. R., & Bulun, S. E. (1994). Aromatase cytochrome p450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Reviews*, 15(3), 342–355. Scopus. <https://doi.org/10.1210/edrv-15-3-342>
- Siracusa, J. S., Yin, L., Measel, E., Liang, S., & Yu, X. (2018). Effects of bisphenol A and its analogs on reproductive health: A mini review. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 79, 96–123. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.06.005>
- Sitsapesan, R., McGarry, S. J., & Williams, A. J. (1995). Cyclic ADP-ribose, the ryanodine receptor and Ca²⁺ release. *Trends in Pharmacological Sciences*, 16(11), 386–391. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)89080-x](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)89080-x)
- Spikings, E. C., Alderson, J., & St John, J. C. (2007). Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biology of Reproduction*, 76(2), 327–335. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.054536>
- Stouffer, R. L. (1990). Corpus luteum function and dysfunction. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 33(3), 668–689. <https://doi.org/10.1097/00003081-199009000-00030>
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41–45. <https://doi.org/10.1038/47412>
- Stricker, S. A. (1999). Comparative Biology of Calcium Signaling during Fertilization and Egg Activation in Animals. *Developmental Biology*, 211(2), 157–176. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9340>
- Sturgill, T. W., Ray, L. B., Erikson, E., & Maller, J. L. (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and

- activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature*, 334(6184), 715–718. <https://doi.org/10.1038/334715a0>
- Su, Y.-Q., Sugiura, K., Woo, Y., Wigglesworth, K., Kamdar, S., Affourtit, J., & Eppig, J. J. (2007). Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology*, 302(1), 104–117. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.09.008>
- Sun, Breitbart, H., & Schatten, H. (1999). Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reproduction, Fertility, and Development*, 11(7–8), 443–450. <https://doi.org/10.1071/rd00014>
- Sun, & Schatten, H. (2006). Role of NuMA in vertebrate cells: Review of an intriguing multifunctional protein. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 11, 1137–1146. <https://doi.org/10.2741/1868>
- Sun, Wu, G. M., Lai, L., Park, K. W., Cabot, R., Cheong, H. T., Day, B. N., Prather, R. S., & Schatten, H. (2001). Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)*, 122(1), 155–163.
- Sutani, T., Yuasa, T., Tomonaga, T., Dohmae, N., Takio, K., & Yanagida, M. (1999). Fission yeast condensin complex: Essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. *Genes & Development*, 13(17), 2271–2283.
- Swann, K., & Yu, Y. (2008). The dynamics of calcium oscillations that activate mammalian eggs. *The International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6), 585–594. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072530ks>
- Szollosi, D. (1967). Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and Hamster eggs. *The Anatomical Record*, 159(4), 431–446. <https://doi.org/10.1002/ar.1091590412>
- Szollosi, D., Calarco, P., & Donahue, R. P. (1972). Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. *Journal of Cell Science*, 11(2), 521–541.
- Takagi, Y., Talbot, N. C., Rexroad, C. E., & Pursel, V. G. (1997). Identification of pig primordial germ cells by immunocytochemistry and lectin binding. *Molecular Reproduction and Development*, 46(4), 567–580. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199704\)46:4<567::AID-MRD14>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199704)46:4<567::AID-MRD14>3.0.CO;2-T)
- Tam, P. P., Zhou, S. X., & Tan, S. S. (1994). X-chromosome activity of the mouse primordial germ cells revealed by the expression of an X-linked lacZ transgene. *Development (Cambridge, England)*, 120(10), 2925–2932.
- Tamaoki, B. (1973). Steroidogenesis and cell structure. Biochemical pursuit of sites of steroid biosynthesis. *Journal of Steroid Biochemistry*, 4(1), 89–118. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(73\)90084-8](https://doi.org/10.1016/0022-4731(73)90084-8)
- Tanrikut, E., Karaer, A., Celik, O., Celik, E., Otlu, B., Yilmaz, E., & Ozgul, O. (2014). Role of endometrial concentrations of heavy metals (cadmium, lead, mercury and arsenic) in the aetiology of unexplained infertility. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 179, 187–190. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.05.039>
- Tarin, J. J. (1996). Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Molecular Human Reproduction*, 2(10), 717–724. <https://doi.org/10.1093/molehr/2.10.717>

- Taskinen, H., Anttila, A., Lindbohm, M. L., Sallmen, M., & Hemminki, K. (1989). Spontaneous abortions and congenital malformations among the wives of men occupationally exposed to organic solvents. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 15(5), 345–352.
<https://doi.org/10.5271/sjweh.1839>
- Telfer, E. E. (1996). The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Theriogenology*, 45(1), 101–110. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00359-G](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00359-G)
- Telfer, E. E., & Anderson, R. A. (2019). The existence and potential of germline stem cells in the adult mammalian ovary. *Climacteric*, 22(1), 22–26. <https://doi.org/10.1080/13697137.2018.1543264>
- Terasaki, M. (1994). Redistribution of cytoplasmic components during germinal vesicle breakdown in starfish oocytes. *Journal of Cell Science*, 107(7), 1797–1805. <https://doi.org/10.1242/jcs.107.7.1797>
- Tokura, T., Noda, Y., Goto, Y., & Mori, T. (1993). Sequential observation of mitochondrial distribution in mouse oocytes and embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 10(6), 417–426.
<https://doi.org/10.1007/BF01228092>
- Tomizawa, S.-I., Nowacka-Woszek, J., & Kelsey, G. (2012). DNA methylation establishment during oocyte growth: Mechanisms and significance. *The International Journal of Developmental Biology*, 56(10–11–12), 867–875. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120152gk>
- Toner, F., Allan, G., Dimond, S. S., Waechter, J. M., & Beyer, D. (2018). In vitro percutaneous absorption and metabolism of Bisphenol A (BPA) through fresh human skin. *Toxicology in Vitro*, 47, 147–155.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.11.002>
- Trapphoff, T., Heiligentag, M., El Hajj, N., Haaf, T., & Eichenlaub-Ritter, U. (2013). Chronic exposure to a low concentration of bisphenol A during follicle culture affects the epigenetic status of germinal vesicles and metaphase II oocytes. *Fertility and Sterility*, 100(6), 1758–1767.e1.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.08.021>
- Tung, J. J., Hansen, D. V., Ban, K. H., Loktev, A. V., Summers, M. K., Adler, J. R., & Jackson, P. K. (2005). A role for the anaphase-promoting complex inhibitor Emi2/XErp1, a homolog of early mitotic inhibitor 1, in cytosolic factor arrest of *Xenopus* eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(12), 4318–4323. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501108102>
- US EPA. (2014). *Bisphenol A Alternatives in Thermal Paper*. 520.
- Van Blerkom, J. (2011). Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*, 11(5), 797–813. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.09.012>
- Vandenberg, L. N. (2014). Low-Dose Effects of Hormones and Endocrine Disruptors. In *Vitamins & Hormones* (Roč. 94, s. 129–165). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800095-3.00005-5>
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., & Myers, J. P. (2012). Hormones and endocrine-

- disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews*, 33(3), 378–455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>
- Vastenhouw, N. L., Zhang, Y., Woods, I. G., Imam, F., Regev, A., Liu, X. S., Rinn, J., & Schier, A. F. (2010). Chromatin signature of embryonic pluripotency is established during genome activation. *Nature*, 464(7290), 922–926. <https://doi.org/10.1038/nature08866>
- Verlhac, M. H., Kubiak, J. Z., Clarke, H. J., & Maro, B. (1994). Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development (Cambridge, England)*, 120(4), 1017–1025. <https://doi.org/10.1242/dev.120.4.1017>
- Verlhac, M. H., Lefebvre, C., Guillaud, P., Rassinier, P., & Maro, B. (2000). Asymmetric division in mouse oocytes: With or without Mos. *Current Biology: CB*, 10(20), 1303–1306. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00753-3](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00753-3)
- Vervliet, P., Gys, C., Caballero-Casero, N., & Covaci, A. (2019). Current-use of developers in thermal paper from 14 countries using liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Toxicology*, 416, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.02.003>
- Virshup, D. M., & Kaldis, P. (2010). Enforcing the Greatwall in Mitosis. *Science*, 330(6011), 1638–1639. <https://doi.org/10.1126/science.1199898>
- Wallace, D. C. (2010). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/em.20586>
- Wang, T., Han, J., Duan, X., Xiong, B., Cui, X.-S., Kim, N.-H., Liu, H.-L., & Sun, S.-C. (2016). The toxic effects and possible mechanisms of Bisphenol A on oocyte maturation of porcine *in vitro*. *Oncotarget*, 7(22), 32554–32565. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8689>
- Ward, G. E., & Kirschner, M. W. (1990). Identification of cell cycle-regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell*, 61(4), 561–577. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90469-u](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90469-u)
- Wassarman, P. M. (1988). Zona pellucida glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry*, 57, 415–442. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.002215>
- Wassarman, P. M., & Josefowicz, W. J. (1978). Oocyte development in the mouse: An ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. *Journal of Morphology*, 156(2), 209–235. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051560206>
- Wassarman, P. M., & Letourneau, G. E. (1976). RNA synthesis in fully-grown mouse oocytes. *Nature*, 261(5555), 73–74. <https://doi.org/10.1038/261073a0>
- Watanabe, N., Vande Woude, G. F., Ikawa, Y., & Sagata, N. (1989). Specific proteolysis of the c-mos proto-oncogene product by calpain on fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*, 342(6249), 505–511. <https://doi.org/10.1038/342505a0>
- Wear, H. M., McPike, M. J., & Watanabe, K. H. (2016). From primordial germ cells to primordial follicles: A review

- and visual representation of early ovarian development in mice. *Journal of Ovarian Research*, 9(1), 36.
<https://doi.org/10.1186/s13048-016-0246-7>
- Welshons, W. V., Thayer, K. A., Judy, B. M., Taylor, J. A., Curran, E. M., & vom Saal, F. S. (2003). Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environmental Health Perspectives*, 111(8), 994–1006. <https://doi.org/10.1289/ehp.5494>
- Wu, B., Ignatz, G., Currie, W. B., & Yang, X. (1997). Expression of Mos proto-oncoprotein in bovine oocytes during maturation in vitro. *Biology of Reproduction*, 56(1), 260–265.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod56.1.260>
- Wylie, C. C. (1993). The biology of primordial germ cells. *European Urology*, 23(1), 62–66; discussion 67.
<https://doi.org/10.1159/000474571>
- Xin, F., Jiang, L., Liu, X., Geng, C., Wang, W., Zhong, L., Yang, G., & Chen, M. (2014). Bisphenol A induces oxidative stress-associated DNA damage in INS-1 cells. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 769, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.04.019>
- Yadav, I. C., Devi, N. L., Syed, J. H., Cheng, Z., Li, J., Zhang, G., & Jones, K. C. (2015). Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Science of The Total Environment*, 511, 123–137.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.041>
- Yamamoto, K. R. (1974). Characterization of the 4 S and 5 S forms of the estradiol receptor protein and their interaction with deoxyribonucleic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7068–7075.
- Yang, L., Baumann, C., De La Fuente, R., & Viveiros, M. M. (2020). Mechanisms underlying disruption of oocyte spindle stability by bisphenol compounds. *Reproduction (Cambridge, England)*, 159(4), 383–396.
<https://doi.org/10.1530/REP-19-0494>
- Yue, C., White, K. L., Reed, W. A., & Bunch, T. D. (1995). The existence of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in mature bovine oocytes. *Development (Cambridge, England)*, 121(8), 2645–2654.
<https://doi.org/10.1242/dev.121.8.2645>
- Zhang, M., Su, Y.-Q., Sugiura, K., Xia, G., & Eppig, J. J. (2010). Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6002), 366–369.
<https://doi.org/10.1126/science.1193573>
- Zhao, C., Dahlman-Wright, K., & Gustafsson, J.-Å. (2010). Estrogen Signaling via Estrogen Receptor β . *Journal of Biological Chemistry*, 285(51), 39575–39579. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.180109>
- Žalmanová, T., Hošková, K., Nevoral, J., Adámková, K., Kott, T., Šulc, M., Kotíková, Z., Prokešová, Š., Jílek, F., Králíčková, M., & Petr, J. (2017). Bisphenol S negatively affects the meiotic maturation of pig oocytes. *Scientific Reports*, 7(1), 485. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00570-5>