

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Přírodovědecká fakulta**

**Studijní program: Reprodukční a vývojová biologie**



**Bc. Viktorie Laštůvková**

**Vliv lysmeralu na průběh meiotického zrání prasečích oocytů *in vitro***  
**Effect of on *in vitro* maturation of porcine oocytes**

Diplomová práce

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

Praha, 2022

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a 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 21. dubna 2022

.....

Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala svému vedoucímu práce panu prof. Ing. Jaroslavu Petrovi, DrSc. a celému jeho týmu laboratoře reprodukční biologie, zejména Ing. Tereze Žalmanové, Ph.D. a Ing. Šárce Prokešové, Ph.D. za jejich vstřícný přístup, užitečné rady, ochotu a především čas, který mi při psaní této diplomové práce věnovali. Dále bych ráda poděkovala rodině, partnerovi a přátelům za podporu po celou dobu mého studia.

## Abstrakt

Lysmeral (Lilial, Butylphenyl Methylpropional) je synteticky vyráběný aldehyd. Používá se pro svoji typickou vůni připomínající konvalinky jako parfémová složka produktů v kosmetickém průmyslu. Typicky ho nacházíme například i v čisticích prostředcích. Figuruje na seznamu 26 nejznámějších syntetických alergenů a byla prokázána jeho přítomnost v moči lidí a následně i v odpadních vodách. Podle některých názorů by měl být lysmeral zařazen do kategorie endokrinních disruptorů, což jsou látky, které svým působením mohou narušovat endokrinní systém organismu. Jelikož tyto substance často ovlivňují reprodukci savců, je v zájmu společnosti se jimi zabývat, vzhledem k tomu, že se vyskytují běžně v prostředí. Lysmeral nebyl před uvedením na trh řádně testován a všechny jeho vlivy na organismy stále nejsou známy. Hypotézou této diplomové práce je, že expozice lysmeralem způsobuje nežádoucí změny v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů *in vitro* a cílem je zkoumat vliv lysmeralu v koncentracích odpovídajících běžným expozicím člověka, na specifické markery meiotického zrání prasečích oocytů. Výsledky potvrzují negativní vliv lysmeralu na plynulou progresi meiotického zrání a dosažení konečného stádia maturace prasečích oocytů *in vitro*. Byl také prokázán vliv lysmeralu na zvýšenou incidenci abnormalit dělicího vřeténka a dvouvláknových zlomů DNA. Vliv lysmeralu na metylaci histonu H3K4me3 nebyl prokázán. Obecně naše výsledky poukazují na možná rizika spojená s využíváním této syntetické látky a apelují na bližší a důkladnější prozkoumání jejího vlivu na organismy a reprodukci živočichů včetně člověka.

### Klíčová slova

oocyt, meiotické zrání, lysmeral, endokrinní disruptor, prase

## **Abstract**

Lysmeral (Lilial, Butylphenyl Methylpropional) is a synthetically produced aldehyde. It is used for its typical lily of the valley-like scent as a perfume ingredient in cosmetic products. It is typically found, for example, in cleaning products. It is on the list of the 26 most well-known synthetic allergens and has been shown to be present in human urine and subsequently in wastewater. According to some opinions, lysmeral should be classified as an endocrine disruptor, which are substances that can interfere with the body's endocrine system. As these substances often affect mammalian reproduction, it is in society's interest to address them, given that they are commonly found in the environment. Lysmeral was not properly tested before being placed on the market and all its effects on organisms are still unknown. The hypothesis of this thesis is that exposure to lysmeral causes undesirable changes in the meiotic maturation of porcine oocytes in vitro and the aim is to investigate the effect of lysmeral, at concentrations corresponding to normal human exposures, on specific markers of meiotic maturation of porcine oocytes. The results confirm the negative effect of lysmeral on the smooth progression of meiotic maturation and the achievement of the final stage of porcine oocyte maturation in vitro. The effect of lysmeral on the increased incidence of division spindle abnormalities and double-stranded DNA breaks was also demonstrated. The effect of lysmeral on histone H3K4me3 methylation was not demonstrated. Overall, our results highlight the potential risks associated with the use of this synthetic substance and call for a closer and more thorough investigation of its effects on organisms and animal reproduction, including humans.

### **Key words**

oocyte, meiotic maturation, lysmeral, endocrine disruptor, pig

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Literární rešerše</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1 Savčí oogeneze</b> .....	<b>2</b>
2.1.1 Proliferace PGC .....	2
2.1.2 Růstová fáze .....	4
<i>Nárůst syntézy RNA</i> .....	4
<i>Reorganizace organel</i> .....	5
<i>Zona pellucida</i> .....	6
<i>Vývoj folikulu (folikulogeneze)</i> .....	7
<i>Závěr růstové fáze</i> .....	10
2.1.3 Meiotické zrání .....	11
<i>Jaderné zrání</i> .....	12
<i>Cytoplazmatické zrání</i> .....	13
<i>Regulace meiotického zrání</i> .....	15
<i>Vybrané markery meiotického zrání</i> .....	20
<b>2.2 Reprodukčně toxické látky</b> .....	<b>24</b>
2.2.1 Lysmeral (2-(4-terc-butylbenzyl)propionaldehyd) .....	28
<b>3. Hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>31</b>
<b>4. Materiály a metodika</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1 Chemikálie</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2 Izolace oocytů z ovárií</b> .....	<b>33</b>
<b>4.3 Kultivace oocytů</b> .....	<b>33</b>
<b>4.4 Ošetření oocytů</b> .....	<b>33</b>
<b>4.5 Imunocytochemie</b> .....	<b>34</b>
4.5.1 Lokalizace $\alpha$ -tubulinu .....	34
4.5.2 Lokalizace histonu H3K4me3 .....	34
<b>4.6 Tunel assay</b> .....	<b>35</b>
<b>4.7 Konfokální mikroskopie a analýza obrazu</b> .....	<b>35</b>
<b>4.8 Statistická analýza</b> .....	<b>35</b>

<b>5. Výsledky</b> .....	<b>37</b>
5.1 Vliv lysmeralu na progresi meiotického zrání.....	37
5.2 Vliv lysmeralu na formaci dělicího vřeténka v průběhu meiotického zrání .	38
5.3 Vliv lysmeralu na integritu chromatinu v průběhu meiotického zrání.....	40
5.4 Vliv lysmeralu na změnu v methylaci DNA a histonu H3K4me3 .....	42
<b>6. Diskuze</b> .....	<b>44</b>
<b>7. Závěr</b> .....	<b>51</b>
<b>8. Seznam použité literatury</b> .....	<b>52</b>

## Seznam zkratek

- AC** – adenylát cykláza (adenylate cyclase)
- AJ** – adherentní spoje (adherent junctions)
- APC** – komplex podporující anafázi (anaphase-promoting complex)
- ATP** – adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
- BMP-15** – kostní morfogenetický protein 15 (bone morphogenetic protein 15)
- BPA** – bisfenol A (bisphenol A - 4,4'-(propane-2,2-diyl)diphenol)
- BPS** – bisfenol S (bisphenol S - 4,4'-sulfonyldiphenol)
- Brg1** – Brahma-related gene-1
- cAMP** – cyklický adenosin monofosfát (cyclic adenosine monophosphate)
- CDC25B** – fosfatáza (cell division cycle 25B phosphatase)
- Cdh1** – Kadherin 1 (Cadherin 1)
- CDK1** – cyklin dependentní kináza 1 (Cyclin dependent kinase 1)
- Cdx2** – Caudal Type Homeobox 2
- cGMP** – cyklický guanosen monofosfát (cyclic guanosine monophosphate)
- CNP** – natriuretický peptid typu C (C-type natriuretic peptide)
- CpG** – cytosin trifosfát deoxynukleotid – fosfodiester – guanin trifosfát deoxynukleotid (cytosine triphosphate deoxynucleotide – phosphodiester – guanine triphosphate deoxynucleotide)
- CSF** – cytostatický faktor (cytostatic factor)
- DBS** – dvouvláknové zlomy (double strand)
- DES** – diethylstilbestrol
- DNA** – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
- Dnmt1** – DNA methyl transferáza 1 (DNA methyl transferase 1)
- DV** – dělicí vřeténko (meiotic spindle)
- E2** – estradiol
- EM** – epigenetické modifikace
- ER** – Endoplazmatické retikulum
- ERK** – extracelulárně regulované kinázy (extracellular regulated kinases)
- ESB** – Banka environmentálních vzorků (Environmental Specimen Bank)
- FIG $\alpha$**  – faktor zárodečné linie alfa (factor in the germline alpha)
- FSH** – folikuly stimulující hormon (follicle stimulating hormone)
- GA** – Golgiho aparát
- GDF9** – růstový diferenační faktor 9 (growth differentiation factor 9)



**GerES V** – německý průzkum životního prostředí (German Environmental Survey V)

**GJ** – mezerové spoje (gap junctions)

**GPR, GPR3, GPR12** – receptory spřažené s G-proteiny (G-protein coupled receptors)

**GV** – zárodečný váček (germinal vesicle)

**GVBD** – rozpad zárodečného váčku (Germinal vesicle breakdown)

**HBM** – biomonitoring lidské populace (human biomonitoring)

**HDAC8** – histon-deacetyláza 8 (Histone deacetylase 8)

**HMT** – methyl – histontransferázy

**Hox** – homeobox geny

**ICSI** – intracytoplasmatická injekce spermie (intracytoplasmic sperm injection)

**IP3r** – inositol-1,4,5-fosfát receptor (Inositol trisphosphate receptor)

**KG** – kortikální granule

**KIFC1** – (kinesin superfamily protein C1)

**LC-MS/MS** – (liquid chromatography-tandem mass spektrometry)

**LH** – luteinizační hormon

**LLOQ** – spodní limit kvantifikace (lower limit of quantification)

**LysOH** – lysmerol

**M-11** – kyselina hydroxy-lysmerylová

**MAPK** – mitogeny aktivovaná protein kináza (mitogen-activated protein kinase)

**MCF7** – (Michigan Cancer Foundation-7)

**MEK** – mitogeny aktivovaná protein kináza kináza (mitogen-activated protein kinase kinase)

**MI** – metafáze prvního meiotického dělení (metaphase first meiotic division)

**MII** – metafáze druhého meiotického dělení (metaphase second meiotic division)

**Mos** – proto-oncogene, serine/threonine kinase

**MPF** – faktor podporující metafázi (metaphase promoting factor)

**mRNA** – mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)

**MT** – mikrotubul (mikrotubule)

**Mtch** – mitochondrie (mitochondria)

**MTOC** – mikrotubuly organizující centrum (mikrotubule-organizing center)

**NPR2** – (Natriuretic Peptide Receptor 2)

**NTP** – (National Toxicology Program)

**Numa** – jaderný protein mitotického aparátu (nuclear mitotic apparatus protein)

**NURF** – faktory remodelující nukleosom (Nucleosome remodeling factor)

**Oct4** – (Octamer-Binding Protein 4)  
**P90rsk** – (90 kDa ribosomal s6 kinases)  
**PB** – polární tělísko (polar body)  
**PCM** – pericentriónálním materiál  
**PDE, PDE3A, PDE4B** – fosfodiesteráza (phosphodiesterase)  
**PGC** – primordiální zárodečné buňky (primordial germ cells)  
**PKA** – proteinkináza A (proteinkinase A)  
**Plk1** – polo-like kináza 1 (polo-like kinase 1)  
**Pum1** – (pumilio homolog 1)  
**RNA** – ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)  
**Ryr** – ryanodinové receptory (ryanodine receptors)  
**SCCS** – výbor pro bezpečnost spotřebitelů (Scientific Committee on Consumer Safety)  
**SDF1** – (Stromal Cell-Derived Factor 1)  
**T14** – threonin 14  
**TBBA** – kyselina 4-terc-butylbenzoová (4-tert-Butylbenzoic acid)  
**TGF  $\beta$ , TGF  $\beta$ 1** – transformační růstový faktor  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ )  
**TZP** – Transzonální projekce (transzonal projections)  
**UBA** – Německá agentura pro životní prostředí (Umweltbundesamt)  
**Wee MYT1** – (G2 Checkpoint Kinase/Myelin Transcription Factor 1)  
**Y15** – tyrosin 15  
**ZP** – *zona pellucida*  
**ZP1,ZP2,ZP3,ZP4** – proteiny *zona pellucida*  
**Zp1,Zp4,** – geny *zona pellucida*

# 1. Úvod

Již řadu let se mluví o znepokojujícím stavu kontaminace prostředí toxickými látkami, které ovlivňují či potencionálně mohou ovlivňovat lidský organismus. Polutantů životního prostředí je mnoho, nicméně mezi nejznámější a svým účinkem velmi specifické se řadí endokrinní disruptory (ED). Jsou to exogenní substance vstupující do organismu a imitující některé přirozené endogenní hormony, čímž mohou narušit jeho fungování. Látek z řad EDs neustále přibývá, jelikož oprávněně narůstají obavy z jejich využívání a to hlavně pro výrobu produktů, se kterými přicházíme do kontaktu na denní bázi. Jednou z těchto běžně používaných látek, u které vzrůstá podezření, že do kategorie ED spadá, je lysmeral. Jedná se o velmi silný alergen, který bývá často obsažen v kosmetických produktech zejména pro svou typickou konvalinkovou vůni. Byl již detekován v lidské moči, tudíž je prokázáno, že do těla vstupuje. Vzhledem k hormonální aktivitě EDs se zdá být na místě sledovat jejich působení na rozmnožovací soustavu, která je s tou endokrinní silně propojena. Výzkumy již prokázaly negativní efekt mnoha látek z řad EDs na reprodukční soustavy savců i ostatních organismů, nicméně přesné molekulární principy stále objasněné nejsou. Častým účinkem EDs je ovlivňování schopnosti oocytů dozrávat a být vývojově kompetentní. Vývoj savčích gamet je vysoce komplexní a víceúrovňová souhra mnoha s procesů a drah, což však také znamená, že je zde velký prostor pro chyby vedoucí k narušení fyziologických procesů. V případě meiotického zrání oocytů je kladen důraz zejména na správnost asymetrického rozdělení buňky, čímž následně vzniká plnohodnotná samičí gameta předurčená k oplození a úspěšnému vývoji nového embrya. Jak se ukázalo, některé EDs v procesu zrání oocytu ovlivňují jednotlivé stěžejní faktory, jako například utváření dělicího vřetene (DV) a s tím spojené zarovnání chromozomů do metafázní roviny, vydělení pólového tělíska či epigenetické modifikace histonů.

V této práci sledujeme vliv lysmeralu na důležité markery meiotického zrání prasečích oocytů a na jeho celkový průběh. Experimentálním modelem bylo zvoleno prase (*Sus scrofa*), které je v biomedicínských výzkumech využíváno hlavně kvůli své fyziologické podobnosti s lidským organismem.

## 2. Literární rešerše

### 2.1 Savčí oogeneze

Proces přeměny samičích primordiálních zárodečných buněk (PGC - primordial germ cells) ve zralé pohlavní buňky se souhrnně nazývá oogeneze. Začíná již v prenatalním stádiu vývoje savčích samic. Podstatou je meióza, která mimo jiné zahrnuje redukci chromozomů v jádře buněk na polovinu. Tak vznikají buňky haploidní, které následně mohou dozrávat ve zralé pohlavní buňky. Obecně se dá oogeneze rozdělit na 3 hlavní fáze, kterými jsou proliferace, růst a zrání oocytů. V následujících kapitolách se budu věnovat popisu těchto jednotlivých fází savčí oogeneze.

#### 2.1.1 Proliferace PGC

Raná stádia oocytů jsou PGC (Witchi, 1948; Mintz, 1957; Hancock *et al.*, 2021) dle dosavadních výzkumů tyto buňky pochází z proximálního epiblastu, kde vznikají indukci buněk extraembryonálního ektodermu a viscerálního endodermu. Obě tyto tkáně obklopují epiblastové buňky a uvolňují do jejich okolí řadu faktorů, například c-kit ligand (Hutt *et al.*, 2006), transformační růstový faktor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$  - transforming growth factor beta 1) (Chuva de Sousa Lopes *et al.*, 2005) a chemokin SDF1 (Stromal Cell-Derived Factor 1) (Molyneaux *et al.*, 2003) a takto ovlivněné buňky jsou kompatibilní k přeměně v PGC. Během časně gastrulace se vytvoří shluk PGC (Ginsburg *et al.*, 1990; Saitou *et al.*, 2002; Ohinata *et al.*, 2005), které začnou mitotickým dělením zvyšovat svůj počet a postupně migrují přes endoderm vyvíjejícího se střeva. Když PGCs překonají endoderm, dostanou se do mezenteria, kde začnou kolonizovat oblast budoucích gonád (Pepling, 2006). Migrace jako taková je řízená lokální produkcí cytokinů (u myši působí jako atraktant chemokin SDF1 (Molyneaux *et al.*, 2003)). Regulace prasečích a lidských PGC je ale přes veškeré úsilí stále málo prozkoumaná a ne všechny mechanismy byly plně popsány a pochopeny. Savčí samičí PGC po usazení a ztrátě motility začnou diferencovat v oogonie, které jsou již vývojovým stádiem oocytů. Oogonie se soustavně mitoticky dělí, čímž zvyšují svoji populaci v oblasti genitální lišty (Picton *et al.*, 1998). U hlodavců dojde k zmnožení na stovky tisíc PGC, u primátů to jsou miliony (De Felici *et al.*, 2005). Hned jak četné dělení ustane, dojde k masivnímu odumírání buněk, což zapříčiní pokles populace na přibližně jednu třetinu z původního počtu zmnožených PGC (Black & Erickson, 1968). Důvod zániku téměř dvou třetin populace PGC je stále málo znám, nicméně existují různé teorie. Jednou z nich je například to, že ztráta perinatálních

PGC je vývojově řízeným procesem, odlišným od folikulární atrezie, kterou můžeme pozorovat v dospělém organismu a slouží k přímé nutritivní podpoře přeživších buněk (Pepling & Spradling, 2001). Po usazení PGC v genitální liště dochází ke změně genové exprese oogonií, což je jeden ze zásadních reprogramačních procesů. Ogonie jsou propojeny cytoplazmatickými můstky, díky kterým mezi nimi dochází k mezibuněčné komunikaci. Dále zde také dochází ke komunikaci s epiteliálními pregranulózními somatickými buňkami. Vytváří společně tzv. ovariální provazce, které jsou raným stádiem vaječníků (Guigon & Magre, 2006). Periferně jsou obklopeny bazální membránou, která zajistí oddělení od mezenchymálních buněk vyvíjejícího se ovaria (Sawyer *et al.*, 2002).

V dalším stádiu oogeneze dojde k rozvolňování cytoplazmatických můstků, jednotlivé buňky se osamostatní a mohou se kolem nich začít tvořit jednovrstevné epitely somatických buněk, tzv. primordiální folikuly (Pepling & Spradling, 2001). Mezi oocyty a somatickými buňkami, které je obklopují, dochází k interakci, na níž se podílí transkripční faktor FIG- $\alpha$  (factor in the germline alpha), který je zásadním faktorem hlavně na počátku folikulogeneze, což bylo prokázáno v experimentu, kde u myší s knock-outem genu pro tento faktor nedocházelo k formování primordiálních folikulů (Soyal *et al.*, 2000). Dle obecně přijímaného dogmatu, je počet primordiálních folikulů přítomných po narození konečným oocytárním rezervoárem, jenž se během celého reprodukčního života ženy pouze snižuje. Proti tomu však stojí poznatky z několika experimentů, kde byla potvrzena přítomnost kmenových buněk ve vaječnících i během postnatálního života, což naznačuje, že proces diferenciací nových oocytů může probíhat i během života po narození (Bukovsky *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2004).

PGC ztratí svůj kmenový potenciál při vstupu do meiózy, diferencují v oocyty a zahájí tak druhou fázi oogeneze. Konkrétně u člověka je uváděn konec mitotického dělení oogonií a začátek meiotického dělení oocytů do 5. měsíce intrauterinního vývoje plodu (Baker & Zuckerman, 1963; Peters *et al.*, 1970).

Po zahájení meiózy projdou oocyty stádiu profáze prvního meiotického dělení, kterými jsou leptotene, zygotene a pachytene, až se zastaví v posledním stádiu diplotene. Jedná se o první meiotický blok, ve kterém primární oocyt setrvává až do doby pohlavní dospělosti savčího organismu, tedy až do puberty (Picton *et al.*, 1998). Během

tohoto procesu dojde hlavně v jádře k mnoha změnám, kondenzuje se chromatin (vytvoří kompaktní struktury), spárují se homologní chromozomy a také dojde k prokřížení nesesterských chromatid a následně k jejich výměně, čemuž se říká crossing-over (Bojko, 1985; Cheng *et al.*, 2009).

## 2.1.2 Růstová fáze

Jakmile je zahájeno první meiotické dělení, můžeme již mluvit o fázi růstu oocyty. Vlivem masivní tvorby ribonukleové kyseliny (RNA – ribonucleic acid) se u rostoucího oocyty úměrně zvětší jádro, které je v této fázi označováno jako zárodečný/růstový váček (GV - germinal vesicle). Oocyt je na počátku růstové fáze označován jako primární (Areekijserree *et al.*, 2015). Nejen v jádře však dochází ke změnám, v cytoplazmě se například zvýší genová exprese a syntéza RNA, vznikají nové organely, modifikují se stávající a mění se uspořádání intracelulární struktury oocyty. Během růstové fáze se průměr prasečího oocyty zvětší z 30  $\mu\text{m}$  na 120  $\mu\text{m}$  (Motlík & Fulka, 1986; Kanitz *et al.*, 2001).

Fáze růstu oocyty je typická také zvýšenou syntézou proteinů, která je nezbytná nejen pro růst a zrání oocyty, ale také pro vznik zygoty a časná embryonální stádia. Z toho důvodu musí být v oocyty adekvátní množství ribozomů, které dostatečnou a plynulou syntézu zajistí. Jadérko je místem tvorby ribozomálních podjednotek a později během aktivace embryonálního genomu je jadérko přítomno ve fibrilo-granulární formě, což odráží vysokou aktivitu syntézy ribozomů a tím i proteinové syntézy. Naproti tomu oocyt primordiálního folikulu je transkripčně neaktivní a jadérko se skládá výhradně z granulární části, což signalizuje absenci aktivity syntézy ribozomů (Crozet, 1981; Motlík *et al.*, 1984).

### **Nárůst syntézy RNA**

Zvýšení RNA syntézy je klíčovým krokem, primárně kvůli samotnému růstu oocyty, ale také pro uskladnění syntetizované RNA. Od ukončení růstu oocyty, až po ranné embryo není zaznamenána transkripční aktivita a jsou využívány zásoby maternální messengerové RNA (mRNA), které byly vytvořeny právě v růstové fázi. Měřením rychlosti inkorporace 3H-uridinu bylo prokázáno, že syntéza RNA je plně aktivní během rané oogeneze, ale jak oocyt roste, tato aktivita se vypíná a v době, kdy oocyt

dosáhne plné velikosti, je zbývající aktivita omezena na jádro (Moore & Lintern-Moore, 1978). Předpokládalo se, že ve stádiu osmi buněk je opět pozorován nárůst syntézy RNA (Tesařík *et al.*, 1988; Yan *et al.*, 2013), nicméně nedávné výzkumy ukazují, že k reaktivaci genomu pravděpodobně dochází u lidských embryí již ve stádiu zygoty (Asami *et al.*, 2022). Regulačním mechanismem skladování a využívání maternálních mRNA je polyadenylace (Vassalli *et al.*, 1989). Jde o posttranskripční modifikaci, kdy dochází k přidávání nukleotidů, konkrétně adenosin monofosfátu, na 3' konec mRNA transkriptu. Tato sekvence je nekódující a slouží k předurčování osudu transkriptu (Brawerman, 1981). Přítomnost mRNA s poly A koncem dlouhým až 150 nukleotidů dává po vstupu do cytoplasmu signál pro translaci. Pokud je poly A konec dlouhý pouze 30-40 nukleotidů, znamená to předurčení k uskladnění (Morgan *et al.*, 2017).

Příklady maternálních genů jsou *Cdx2* (Caudal Type Homeobox 2) (Blij *et al.*, 2012) a *Oct4* (Octamer-Binding Protein 4) (Frum *et al.*, 2013), které oba zodpovídají za prvotní liniovou specifikaci dělicího se raného embrya. Dále pak gen pro maternální E-cadherin - *Cdh1* (Cadherin 1), zajišťující buněčnou adhezi během kompaktace, nebo gen *Brg1* (Brahma-related gene-1) ovlivňující aktivaci embryonálního genomu a remodelaci chromatinu (Bultman *et al.*, 2006).

Dalším mechanismem podílejícím se na regulaci translace maternálních mRNA je formování RNA granul z jednotlivých vláken, která nemají být translatována. Jedná se o takzvané P-bodies (Cougot *et al.*, 2004), což jsou útvary složené z konkrétní mRNA a 22 doposud identifikovaných proteinů (Luo *et al.*, 2018). Tento mechanismus je typický například pro gen cyklinu B, který zodpovídá za znovuzahájení meiotického zrání. Konkrétně se aktinová vlákna spolu s proteinem Pum1 (pumilio homolog 1) váží na transkripty genu pro cyklin B a znemožňují tak jeho translaci (Kotani *et al.*, 2013)

## **Reorganizace organel**

V růstové fázi oocyty dochází k zásadním změnám v prostorové organizaci organel, které se koncentrují blízko jádra a teprve s pozdějšími vývojovými stádii začnou migrovat směrem ke kortexu. Dojde ke zvýšení počtu většiny organel, zejména pak ribozomů a dále také mitochondrií (Mtch), které jsou nezvykle zakulacené a s méně kristami (Stojkovic *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2010). Se zvýšením počtu Mtch zde však úměrně nestoupá i produkce energie (Wassarman & Josefowicz, 1978). Golgiho aparát

(GA) se zvětšuje, transformuje a z plochých spojených membránových útvarů se stávají separátní jednotky, které putují k membráně oocyty, kde se exportem glykoproteinů podílí na výstavbě *zony pellucidy* (ZP). Další funkcí GA je participace na formování kortikálních granulí (KG). Spolu s endoplazmatickým retikulem, které je také během fáze růstu zvětšeno a přesunuto ze středu do kortikální oblasti, se podílejí na kortikální reakci – mechanismu zabraňujícímu vniku více spermií do jednoho oocyty. Endoplazmatické retikulum (ER) má na starosti zvýšení koncentrace vápníku, který je potřebný k samotnému vylití KG (Mehlmann *et al.*, 1995).

### ***Zona pellucida***

Jak již bylo zmíněno, v růstové fázi se také tvoří glykoproteinový obal oocyty nazývaný ZP. Jedná se o ochranný „plášť“ oocyty a téměř u všech placentálů se ZP skládá ze čtyř nebo tří vysoce glykosylovaných, konzervovaných proteinů ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4 (Wassarman, 2008). ZP2 a ZP3 se vyskytují u savců běžně a u některých druhů jsou ještě navíc přítomny buď ZP1 nebo ZP4, popřípadě oba glykoproteiny (Goudet *et al.*, 2008). Například myší ZP obsahuje tři proteiny - ZP1, ZP2 a ZP3 (Bleil & Wassarman, 1980). Bioinformatickou analýzou bylo potvrzeno, že v myším genomu je *Zp4* gen přítomný jako pseudogen. Stalo se tak v důsledku mikrolece nukleotidů, která vedla k posunu rámce a vzniku předčasného stop kodonu v jeho transkriptu (Goudet *et al.*, 2008). Další skupina živočichů, do které patří prasata (Hedrick & Wardrip, 1987), krávy (Noguchi *et al.*, 1994) a psi (Goudet *et al.*, 2008), má ZP složenou z proteinů ZP2, ZP3 a ZP4. Poslední skupinou jsou živočichové, jejichž ZP je sestavena ze všech čtyř proteinů a patří sem například člověk (Lefièvre *et al.*, 2004) a křeček (Izquierdo-Rico *et al.*, 2009). Geny *Zp1* a *Zp4* jsou paralogy a předpokládá se, že se vyvinuly ze stejného genu společného předka duplikací, sdílejí tedy maximální podobnost sekvencí (Goudet *et al.*, 2008).

Zonální glykoproteiny vzájemnou interakcí vytváří 10-25  $\mu\text{m}$  tlustý obal obklopující celý oocyt. Strukturně mají zonální proteiny různé, velmi odlišné role. Hlavními strukturními pilíři jsou proteiny ZP2 a ZP3, které ve formě heterodimeru propojují ZP1. ZP3 hraje pravděpodobně roli ligandu pro spermie (primární vazba spermie a oocyty) a společně se ZP4 (Nakano & Yonezawa, 2001; Zeng *et al.*, 2021) se podílí na spuštění akrozomální reakce. ZP2 pak zajistí, že se akrozomálně zreagované spermie udrží na ZP (Yurewicz *et al.*, 1998)



## Vývoj folikulu (folikulogeneze)

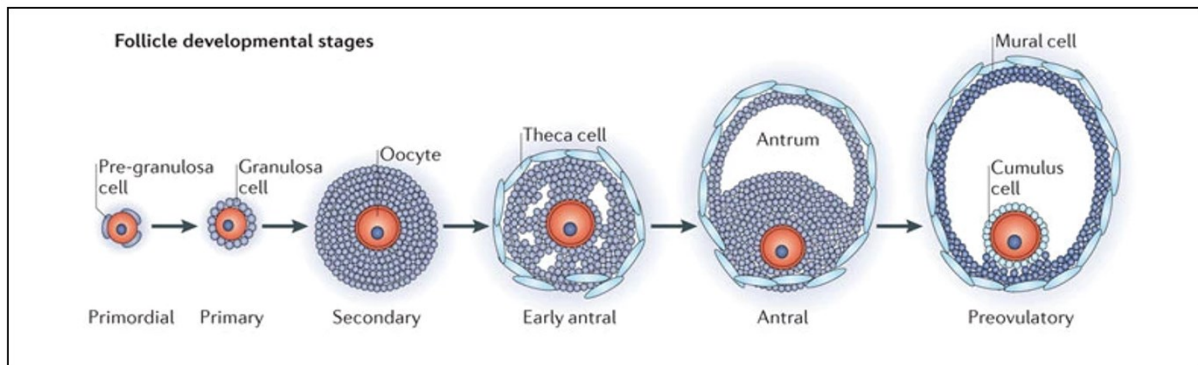
Do zahájení růstové fáze o folikulu mluvíme jako o primordiálním. Jedná se o jednovrstevný epitel pregranulózních buněk původem z mesonefros (Hummitzsch *et al.*, 2013), které s oocytem komunikují různými způsoby a na několika úrovních. Nejvíce typický je mechanismus interakce skrze mezerové (GJ - gap junctions) a adhezivní spoje (AJ - adherent junctions) (Anderson *et al.*, 1978). Tyto prvotní buňky jsou ploché a přímo naléhají na oocyt až do doby, než je vytvořena ZP, která mezi somatickými buňkami a oocytem vytvoří bariéru. Interakce mezi oocytem a somatickými buňkami nadále probíhá, nicméně v tomto bodě už jen přes trans-zonální interakce (Jaffe & Egbert, 2017), nebo jak ukazují nedávné výzkumy přes tzv. transzonální projekce (transzonal projections – TZP) (Motta *et al.*, 1994). V případě TZP se jedná o specializované folikulární filopodie, které jsou aktivně a kontinuálně generovány během růstové fáze oogeneze. Skládají se ze struktur bohatých na F-aktin a mikrotubuly (MT), které podporují aktivní pohyb molekul a organel ze somatických buněk směrem k povrchu oocytu. Mechanismus propojení s oocytem je opět přes GJ. Klíčovou roli v jejich tvorbě hraje samotný oocyt prostřednictvím vylučovaného růstového a diferenciativního faktoru 9 (GDF9 - growth differentiation factor 9). TZP poskytují strukturální základ pro složitější vzorce mezibuněčné komunikace, které se objevují v pozdějších fázích vývoje folikulů. S růstem oocytů se počet a strukturní složitost TZP zvyšuje. Dokonce i granulózní buňky, které se nacházejí dvě nebo více vrstev od oocytů v sekundárních folikulech, produkují filopodie, které obcházejí proximální buňky granulózy a překonají i ZP, jen aby se dostaly k oocytu (Makabe *et al.*, 2006; Fushii *et al.*, 2021). Zajímavostí je, že tyto interakce s věkem ženy oslabují. Dle studie El-Hayek *et al.* (2018) existuje i přímo úměrný vztah mezi mírou propojení oocytu se somatickými buňkami a plodností.

Parakrinní signální dráhy, které byly identifikovány studii genové delecce, propojují oogenezi s folikulogenezí. Tyto oocyt-specifické dráhy zahrnují členy pocházející z rodiny transformujících růstových faktorů- $\beta$  (TGF $\beta$  - transforming growth factor  $\beta$ ). Jsou jimi například GDF9 (viz výše) (Dong *et al.*, 1996) nebo kostní morfogenetický protein 15 (BMP15 - bone morphogenetic protein 15) (Persani *et al.*, 2014). Parakrinní růstové faktory vylučované oocyty stimulují metabolismus v přiléhajících somatických buňkách, podporují jejich diferenciaci, proliferaci (Vanderfiyden *et al.*, 1992) a stimulují v nich produkci faktorů regulujících mitózu (Gilchrist *et al.*, 2001). Faktory GDF9 a BMP15 jsou přímo zapojeny do modulace

energetického metabolismu (Sugiura *et al.*, 2005) a biosyntézy cholesterolu (Su *et al.*, 2008), což jsou stěžejní pochody neprobíhající v oocytech, ale jsou vysoce funkční v buňkách granulózy. Konkrétně GDF9 je oocytem syntetizován od stádia primárního folikulu, až po stádium Graafova folikulu (Hussein *et al.*, 2006). Myši s knock-outovaným genem pro GDF9 jsou sterilní (Dong *et al.*, 1996), což je výsledkem zastavení folikulárního vývoje, který je na GDF9 závislý. Kompenzující mechanismy prostřednictvím GDF9 přetrvávají až do raných stádií embryogeneze, kde přebírají odpovědnost za různé signální dráhy, dokud nedojde k reaktivaci embryonálního genomu. Koncentrace GDF koreluje v průběhu oogeneze a rané embryogeneze s kvalitou oocyty či embrya (Li *et al.*, 2022). Díky tomu se o GDF9 přemýšlí jako o potencionálním možném faktoru vylepšujícím úspěšnost metody umělého oplodnění ICSI (intracytoplasmic sperm injection) (Ashourzadeh *et al.*, 2021). Doplňujícím poznatkem také je, že koncentrace GDF9 s věkem ženy klesá a s ním klesá i kvalita oocyty (Gong *et al.*, 2021).

Jak už bylo řečeno, primordiální folikuly zůstávají v klidové fázi až do doby, než jsou k růstu stimulovány (Braw-Tal & Yossefi, 1997), což nastává v období pohlavní dospělosti (Erickson, 1966; Pawlak *et al.*, 2011). V tento moment se z plochých buněk stávají kubické a primordiální folikul se transformuje na primární, jednovrstevný kubický epitel začne nabírat na objemu, přidává se další vrstva buněk a vzniká tak sekundární folikul. Této fázi se také říká preantrální, jelikož je to poslední moment, ve kterém jsou vrstvy folikulárních buněk rovnoměrné a ještě není přítomné antrum. Folikul je v tomto momentě obalen více než jednou vrstvou granulózních buněk. Vrstva buněk přímo ležící na ZP se nazývá *corona radiata*. Jednou z dalších charakteristik preantrálního folikulu, je přítomnost kapilár, tedy krevního zásobení folikulu. V momentě, kdy sekundární folikul začne obalovat speciální typ buněk – buňky thekální (*theca folliculi interna a externa*), jedná se o folikul preantrální. Diferenciace thekálních buněk závisí na více faktorech,

podmínkou pro jejich vznik je například přítomnost dvou nebo více vrstev granulózních buněk a aktivace steroidogenních enzymů (Orisaka *et al.*, 2006).



### Obrázek 1: Vývojová stádia folikulu

Schématický obrázek v jedné rovině shrnuje hlavní stádia folikulogeneze, od primordiálního, až po preovulační folikul. V primordiálním folikulu je přítomna pouze jedna vrstva pregranulózních plochých buněk, které se v primárním stádiu stávají buňkami granulózními, ty se na sebe začnou vrstvit a vzniká folikul sekundární. Jakmile se začnou „bortit“ vrstvy naskládaných granulózních buněk, jedná se o folikul preantrální, ze kterého záhy vzniká folikul antrální, jež je charakterizován vznikem dutiny naplněné tekutinou. Posledním stádiem na obrázku je preovulační folikul, který bývá označován jako Graafův folikul. Převzato z (R. Li & Albertini, 2013)

Antrum je dutina tvořící se mezi folikulárními buňkami a plní se tekutinou (*liquor folliculi*), která hraje významnou roli v meiotické kompetenci oocyty. Konkrétní signál, který spustí formování antrální dutiny nebyl dodnes identifikován. Předpokladem je, že se jedná o souhru několika signálů a stěžejní roli v tomto procesu hrají androgeny, estrogény, luteinizační hormon (LH) a folikulo-stimulační hormon (FSH) (Dewailly *et al.*, 2016; Tasaki *et al.*, 2013). Tvorba folikulárního antra rozděluje populaci buněk granulózy do dvou hlavních skupin: kumulární buňky spojené s oocyty a granulózní buňky lemující folikulární stěnu (Amsterdam & Rotmensch, 1987). S postupujícím vývojem folikulů, který je řízen gonadotropiny a podporován intra-folikulárními regulátory, lze tyto populace rozlišovat z hlediska molekulárního i morfologického. Kumulární buňky například exprimují LH receptory (LHR) ve velmi malé míře, na rozdíl od granulózních buněk folikulární stěny, které je exprimují hojně. Nejvyšší míra exprese je však pozorována v buňkách, které jsou v těsné blízkosti bazální laminy, což je tenká vrstva extracelulárního

materiálu, která odděluje buňky *theca folliculi* od granulózních buněk (Amsterdam *et al.*, 1975).

Vývoj primárního i sekundárního folikulu není závislý na přítomnosti gonadotropinů, nicméně pro optimální fyziologický vývoj preantrálního folikulu jsou nezbytné (Fortune & Eppig, 1979; Casarini *et al.*, 2022). Estrogeny společně s FSH začnou působit na granulózní buňky, které díky tomu začínají proliferovat a výrazně zvýší tvorbu sekretovaných látek, což vede k tvorbě antra a jeho naplnění tekutinou. Jakmile se vytvořené antrum začne plnit folikulární tekutinou, hovoříme o antrálním stádiu folikulu, pokud je antrum zcela naplněné, můžeme tento folikul nazvat Graafovým folikulem. Jak již bylo řečeno, preantrální folikul je závislý na řízení gonadotropiny. Buňky *theca interna* zahajují pod vlivem LH tvorbu androgenů, které se záhy vlivem granulózních buněk konvertují na estrogeny. Tento proces zajišťuje enzym aromatáza. Ve stádiu Graafova folikulu není oocyt uvnitř centralizován, ale je lokalizován na vejconosném hrbolku, který se nazývá *cumulus oophorus* (Polan *et al.*, 1984).

Folikul je pro růst oocyty nepostradatelný a do určitého stádia se vyvíjejí paralelně. Na konci růstové fáze se oocyt dostane do bodu, kdy dosáhne svého velikostního maxima, avšak průměr folikulu se nadále zvětšuje. Buňky folikulu se podílejí na udržení oocyty v profázi I a v případě, že je oocyt z folikulu vyjmut v době prvního meiotického bloku, dojde ke spontánnímu pokračování v meióze (Leibfried & First, 1980; Mehlmann, 2005).

### **Závěr růstové fáze**

V růstové fázi získává oocyt meiotickou kompetenci, tzn. schopnost vystoupit z I. meiotického bloku a pokračovat v procesu meiotického zrání (Motlik *et al.*, 1984). Úspěšné dokončení růstové fáze je spojeno s dosažením plné velikosti oocyty. V průběhu růstu jsou charakterizovány jednotlivé stupně meiotické kompetence, kde každému stupni odpovídá určitý rozměr oocyty. Výzkumný tým Motlik *et al.* (1984) rozčlenil oocyty do tří skupin podle toho, jaký je jejich průměr. U každé z těchto skupin definovali vývojovou kompetenci. Pro meioticky nekompetentní prasečí oocyty je stanoven rozměr 80 – 89  $\mu\text{m}$  a 90 – 99  $\mu\text{m}$ . V průběhu růstu je charakterizováno také období částečné meiotické kompetence (Yanagimachi, 1988). Tyto oocyty ještě nemají všechny potřebné vlastnosti, nicméně jsou už schopné vystoupit z prvního meiotického

bloku a pokračovat v meiotickém zrání, ale stále ještě mají rozptýlen chromatin po celém obsahu nukleoplazmy. Mají dobře viditelné jádérko a to i přes to, že kolem něj nejsou soustředěna chromatinová vlákna. V tomto stupni prasečí oocyty dosahují velikosti 100 – 110  $\mu\text{m}$ . Stupeň plné meiotické kompetence je mimo jiné charakterizován kondenzovaným chromatinem obklopujícím jádérko, které je opět dobře viditelné. Velikost plně meioticky kompetentních prasečích oocytů je 120 – 125  $\mu\text{m}$  (Motlik & Fulka, 1976). S velikostí oocytu koreluje velikost folikulu. V experimentu výzkumné skupiny Marchal *et al.* (2002) bylo prokázáno, že větší a střední folikuly prasnic obsahují ve většině případů oocyty, které jsou meioticky kompetentní, kdežto v malých folikulech jsou častěji částečně meioticky kompetentní či meioticky nekompetentní oocyty (Marchal *et al.*, 2002).

Během růstové fáze se oocyt nachází ve stádiu GV0 kdy je chromatin vláknitě rozprostřen po celém obsahu jádra a jádérko je plně kompaktní. V tento moment nazýváme oocyt částečně meioticky kompetentní (Christmann *et al.*, 1994).

### 2.1.3 Meiotické zrání

Ukončení růstové fáze je charakterizováno obnovením meiotického zrání, tedy uvolněním z prvního meiotického bloku. Po znovuzahájení meiózy se oocyt stále nachází ve stádiu GV a postupně dochází k jeho rozpadu (GVBD – Germinal vesicle breakdown). Jedná se o čtyři plynule na sebe navazující fáze, označené GV1-GV4. Fáze GV1 je charakterizovaná dekonenzovaným chromatinem, který se shlukuje kolem jádérka a vytvoří kolem něj dokonalou prstencovitou strukturu (Zuccotti *et al.*, 1995). Od této fáze již hovoříme o oocytu plně dorostlém a zcela meioticky kompetentním. Ve fázi GV2 je narušena kompaktní struktura chromatinu kolem jádérka a vizuálně připomínající podkovu (Zuccotti *et al.*, 1995). Fáze GV3 je charakteristická postupným rozptylováním chromatinu zpět do celého obsahu jádra. Jádérko je však stále viditelné. Poslední fází je GV4, kde už je chromatin ve shlucích rozptýlen po celé nukleoplazmě, jádérko není viditelné a dochází k úplnému rozpadu jaderné membrány (Motlik & Fulka, 1976; Tan *et al.*, 2009). Jednotlivé fragmenty jaderné membrány jsou obaleny váčky, které jsou spojeny s endoplazmatickým retikulem, což následně usnadní proces znovusestavení membrány po oplození oocytu (Luca *et al.*, 2002).

Na rozpadu jaderné membrány se významně podílejí cytoskeletální proteiny vnitřní strany jaderné membrány – jaderné laminy (Gerace & Blobel, 1980). Proteiny formující tuto hustou a pevnou síť pod jaderným obalem, která určuje mechanické vlastnosti jádra, patří pod intermediální filamenta a vyskytují se jak v buňkách somatických, tak i v oocytech. Tato vláknitá struktura se podílí například i na replikaci deoxyribonukleové kyseliny (DNA – deoxyribonucleic acid), transkripci či na reorganizaci chromatinu v průběhu meiotického zrání (Link *et al.*, 2018).

Pod pojem meiotické zrání spadají dva důležité souběžné procesy, kterými jsou cytoplazmatické a jaderné zrání. I přes to, že se jedná o dva oddělené mechanismy, jsou na sebe vázané, ovlivňují se a jejich úspěšnost závisí na jejich dokonalé souhře. Cytoplazmatické zrání je započato už v průběhu růstové fáze a zahrnuje jak strukturní, tak molekulární změny v cytoplazmě, organizaci organel a distribuci mRNA. Jaderné zrání souhrnně označuje prolomení prvního meiotického bloku, přeměnu primárního oocytu na sekundární, nebo například redukci genetického materiálu na polovinu.

Jedním z nejvýznamnějších stimulů pro znovuzahájení meiotického zrání je pulzační nárůst hladiny LH. Protože oocyt sám nemá receptory pro gonadotropiny, musí být hormonální efekt zprostředkován přes buňky v jeho okolí (Lawrence *et al.*, 1980). Z toho důvodu je v tomto období velice důležitá komunikace oocytu se somatickými buňkami. Zajišťují to GJ které umožní plynulý přenos malých signálních molekul z jedné buňky do druhé.

### **Jaderné zrání**

GVBD je milníkem na pomezí procesu růstu oocytu a pokračování v meióze a u prasat trvá zhruba 24 hodin *in vitro* (Wehrend & Meinecke, 2001). Po úplném dokončení rozpadu membrány a po nárůstu koncentrace LH oocyt pokračuje v meióze metafází I. LH zde hraje roli aktivátora faktorů ovlivňujících jaderné zrání a také eliminuje inhibitory zrání, které oocyt držely v meiotickém bloku. Po znovunastartování se tedy bivalenty chromozomů začnou seřazovat v oblasti ekvatoriální roviny do podoby metafázní destičky. Metafáze I u prasat probíhá mezi 24. – 30. hodinou od počátku kultivace *in vitro* (Wehrend & Meinecke, 2001). Plně vytvořené DV napojuje svoje tubulinová vlákna přes proteinové struktury kinetochory k bivalentům. V anafázi I se seřazené chromozomy napojené na DV přesunou do blízkosti cytoplazmatické membrány, kde následně

v telofázi I proběhne jak rozdělení homologních chromozomů na dvě poloviny, tak právě i asymetrické rozdělení buňky na velký oocyt a malé pólové tělísko (PB - polar body). K telofázi I dochází kolem 34. hodiny od počátku kultivace oocytu *in vitro* (Ocampo *et al.*, 1990). Po dokončení meiózy I následuje interkineze, což je krátká přestávka mezi I. a II. meiózou. Je to fáze „odpočinku“, během které však ještě nedochází k syntéze DNA (Kishimoto, 2003). Profáze II nastupuje hned po interkinezi a oproti profázi I je značně jednodušší a rychlejší. V metafázi II nastává druhý meiotický blok. Chromozomy jsou v tento moment seřazeny v ekvatoriální rovině a DV je vytvořeno. Metafáze II nastává u prasečích *in vitro* kultivovaných oocytů mezi 44. a 48. hodinou od počátku kultivace (Yanagimachi, 1988; Ocampo *et al.*, 1990). V druhém meiotickém bloku oocyty většiny savců zůstávají do doby, než jsou oplozeny, popřípadě než dojde k partenogenetické aktivaci. Partenogenetická aktivace je proces, kdy se oocyt sám od sebe spontánně aktivuje bez přítomnosti spermie. To však znamená u většiny savčích oocytů zánik takto aktivovaného oocytu, jelikož již nemůže být oplozen spermií a nový jedinec z něj také nevzejde (Van Blerkom *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 2003). Druhý meiotický blok je tedy prolomen v momentě aktivace oocytu, nejčastěji splynutím jeho membrán s membránou spermie. Meióza II je dokončena v okamžiku, kdy je vyděleno druhé PB (Corner, 1917; Liu, 2012).

### **Cytoplazmatické zrání**

Vedle jaderného zrání je druhým, nezbytně důležitým procesem také zrání cytoplazmatické. Většina nejdůležitějších organel strategicky mění své uspořádání a postavení v rámci oocytu během přechodu ze stádia GV až k metafázi II. Proces meiotického zrání je přímo závislý na úspěšném dokončení meiotického dělení, redistribuci organel a cytoskeletu a samozřejmě také na transkripční aktivitě, která je předpokladem pro správnou koncentraci všech potřebných faktorů. Kooperace všech těchto procesů je podmínkou pro vývojovou kompetenci oocytu a zejména pak pro úspěšnou aktivaci embryonálního genomu po oplození (Plachot & Crozet, 1992; De Sousa *et al.*, 1998)

Jedním z nejdynamičtějších procesů je seskupování KG a s tím související reorganizace mikrofilament (Maro *et al.*, 1984; Schatten *et al.*, 1986; Kim *et al.*, 1996). KG jsou specializované organely obsahující rozmanitou směs proteinů, enzymů a glykosaminoglykanů, nacházející se výhradně v oocytech. Vznikly odtržením z GA a

podílejí se na prevenci polyspermie tzv. kortikální reakcí (Wessel *et al.*, 2001). Jedná se proces, kdy dojde k mikrofilamenty zprostředkované exocytóze KG, která způsobí změny na povrchu oocyty (Wessel *et al.*, 2002). Ve stádiu GV se KG nacházejí seskupené ve shlucích po celém obsahu oocyty a následně se během dozrávání přesunou k periferii oocyty, do blízkosti membrány, kde od stádia metafáze II vyčkáávají na exocytózu (Hosoe & Shioya, 1997). Cytoskeletální struktury vytvářejí kromě DV také spleť síť, po které se ostatní membránové organely pohybují a zaujímají definované pozice.

Meiotické zrání zastřešuje velké množství nejrůznějších mechanismů a procesů, které vyžadují konzistentní přísun energie. Z hlediska aktivace metabolických drah syntetizujících a fosforylujících proteiny jsou Mtch stěžejními organelami, jelikož jsou zodpovědné za přísun energie v průběhu celého procesu meiotického zrání (Krisher & Bavister, 1998; Stojkovic *et al.*, 2001). Výzkumy na různých savčích modelech ukazují, že i lokalizace Mtch v rámci oocyty je signifikantní a může být i ukazatelem vývojové kompetence oocyty. Z hlediska distribuce Mtch je hodnocena homogenita či heterogenita rozmístění v oocyty. Homogenní distribuce Mtch v celé cytoplazmě je častější ve stádiu GV (Nishi *et al.*, 2003), zatímco heterogenní distribuce je častěji pozorována v oocyty metafáze I nebo II (Torner *et al.*, 2004). Zvýšená míra agregace Mtch kolem jádra svědčí o zrání oocyty, během kterého se distribuce Mtch změnila z homogenní na heterogenní. U vývojově nekompetentních oocytů byly Mtch lokalizovány převážně jen u kortexu. Rozmístění Mtch hraje roli i v pozdějších stádiích vývoje, například homogenní distribuce Mtch u lidských preimplantačních embryí značí jejich horší kvalitu (Wilding *et al.*, 2001). Mimo lokalizaci se v závislosti na fázi, v jaké se oocyt nachází, mění i počet Mtch. Tento fenomén byl pozorován u oocytů prasat (Pawlak *et al.*, 2012) a skotu (Iwata *et al.*, 2011). U PGC před migrací je počet Mtch nízký, pohybuje se kolem 10. Ve stádiu oogenie se počet navýší asi na 200, u primárních oocytů už to je 6000 Mtch na jednu buňku a během zrací fáze lizedetekovat přes 200 000 kopií mitochondriální DNA (mtDNA) v jedné buňce (na jednu organelu připadá 1 nebo 2 kopie mtDNA) (Cummins, 2004; Tarazona *et al.*, 2006; Pawlak *et al.*, 2012). Naproti tomu v oocyttech člověka nebyl zaznamenán signifikantní nárůst kopií mtDNA (Barritt *et al.*, 2002). Faktorem ovlivňujícím počet mtDNA v oocyttech je pravděpodobně i věk. U žen nad 40 let byl detekován snížený počet mtDNA kopií, než v oocyttech žen mladších (Murakoshi *et al.*, 2013).



## Regulace meiotického zrání

Na organizaci a regulaci meiotického zrání má kromě samotného oocyty vliv i extracelulární prostředí, konkrétně například molekulární signální faktory vylučované somatickými buňkami v blízkosti oocyty. Typickou událostí, která je značně řízena těmito faktory, je meiotický blok. Oocyt pozastavuje meiotické dělení a k udržení v tomto stavu mu dopomáhají signální molekuly vylučované zejména murálními a kumulárními buňkami, které jsou s oocytem v těsné blízkosti. V případě vyjmutí komplexu oocyty s přiléhajícími somatickými buňkami z folikulu, dojde k samovolnému obnovení meiózy. (Sela-Abramovich *et al.*, 2008). Mezi signální molekuly regulující meiózu patří například cyklické nukleotidy, mitogen – aktivovaná proteinkináza, vápníkové ionty, cytostatický faktor a řada dalších. Z faktorů, které nepochází přímo z buněk sousedících s oocytem je důležité zmínit hormony, zejména pak LH, FSH nebo steroidní hormony.

### *Cyklické nukleotidy*

Snížení hladiny cyklického adenosin monofosfátu (cAMP - cyclic adenosine monophosphate) produkovaného jak granulózními buňkami, tak oocytem samým, zajistí uvolnění z meiotického bloku a její zvýšení ho naopak udrží. Syntéza cAMP v oocyty je zajištěna cyklizací adenosin-trifosfát (ATP - adenosine triphosphate) enzymem adenylát cyklázou (AC), která je stimulována receptory spřažené s G-proteiny (GPR - G-protein coupled receptors), konkrétně GPR3 (G-protein coupled receptor 3) a GPR12 (G-protein coupled receptor 12) (Mehlmann *et al.*, 1995; Hinckley *et al.*, 2005). V případě, že je oocyt vyjmut z prostředí antrálního folikulu, dojde ke snížení hladiny cAMP a tedy i k prolomení meiotického bloku. Pro zabránění znovuzahájení meiózy je třeba do média, kde se oocyt po extrakci nachází, přidat buď inhibitory cAMP fosfodiesterázy (PDE - phosphodiesterase), která cAMP hydrolyzuje (Dekel & Beers, 1980; Bornslaeger *et al.*, 1986), nebo analogy cAMP, což může být například dibutyryl – cAMP (dbcAMP). PDE je několik typů, pro tento mechanismus je důležité zmínit fosfodiesterázu 3A (PDE-3A) pocházející z oocyty a fosfodiesterázu 4B (PDE-4B) nacházející se v granulózních buňkách (Jin & Conti, 2002; Masciarelli *et al.*, 2004). Inhibitorem PDE je cyklický guanosin monofosfát (cGMP – cyclic guanosine monophosphate), který je produkován guanylát cyklázou, která je součástí tzv. receptoru natriuretického peptid prekursoru – C (NPR2) (Shuhaibar *et al.*, 2017). Aktivita NPR2 je spuštěna vazbou natriuretického peptidu typu C (CNP - C-type natriuretic peptide), který je produkován murálními buňkami

(M. Zhang *et al.*, 2011) a také fosforylací několika juxtamembránových (lokalizovaných těsně pod membránou) serinů a threoninů (Potter, 1998). Exprese genu pro NPR2 je zajištěna estradiolem (E2) (M. Zhang *et al.*, 2011). Zvýšení hladiny LH způsobí pokles syntézy CNP a tím pádem dojde i k útlumu aktivity NRP2, čímž se v oocytu sníží celková koncentrace cGMP (Norris *et al.*, 2009). Jak již bylo popsáno výše, cGMP nepřímo zvyšuje hladinu cAMP a pokud tedy dojde k poklesu jeho koncentrace, projeví se to jako snížení hladiny cAMP a to z důvodu jeho štěpení fosfodiesterázami, které nejsou inaktivovány cGMP. Vlivem poklesu koncentrace cAMP se začnou aktivovat další signální kaskády a výsledkem je prolomení meiotického bloku a GVBD (Bornslaeger *et al.*, 1986; Törnell *et al.*, 1990).

Cílovou molekulou cAMP je také proteinkináza A (PKA), která také souvisí s udržením meiotického bloku. cAMP se přímo naváže na regulační podjednotku neaktivní PKA a tím tento enzym aktivuje. Aktivní PAK se pak podílí na fosforylaci dalších proteinů, které fungují jako mediátory v mechanismech udržování meiotického bloku (Bornslaeger *et al.*, 1986).

#### *MAP kináza (MAPK - mitogen-activated protein kinase)*

Regulaci meiózy pomocí fosforylace proteinů na serinových nebo threoninových zbytcích zajišťuje skupina mitogen-aktivovaných protein kináz (MAPK). Jelikož se jedná o extracelulárně regulované kinázy, bývají označovány také zkratkou ERK (extracelulárně regulované kinázy). Jedná se v podstatě o celé regulační kaskády, na kterých stojí řada mechanismů meiotického zrání a kde MAPK fungují jako iniciátory. V savčích oocytech se MAPK vyskytují ve dvou izoformách – ERK1 a ERK2, z nichž obě mají nezastupitelnou roli v regulaci meiózy (Inoue *et al.*, 1995). K aktivaci obou jsou třeba Mos (Proto-oncogene, serine/threonine kinase) a MEK (Mitogen-activated protein kinase kinase) kinázy, které zprostředkují fosforylaci ERK na aminokyselinových zbytcích tyrosinu a threoninu (Sun *et al.*, 1999). Cytostatický faktor Mos je produktem onkogenu *c-mos* a mimo jiné se zaslouhuje i o aktivaci MEK (C. M. Crews & Erikson, 1992). MAPK mají několik cílových substrátů a jejich aktivita je neměnná i v období přechodu mezi metafází I a II. Jedním z jejich substrátů je kináza p90rsk (90 kDa ribosomal s6 kinases), která pravděpodobně stojí za mnoha regulacemi v průběhu celého buněčného cyklu (Chen & Blenis, 1990; Blenis, 1993; Gross *et al.*, 2001). Další funkcí MAPK je fosforylace

histonů a tím pádem udržování chromatinu v kondenzovaném stavu, čímž je oddalován vstup oocyty do interfáze (Gross *et al.*, 2000). Také se podílí na fosforylaci strukturálních proteinů jaderné obálky laminů, čímž zabraňuje jejímu znovuvytvoření (Ottaviano & Gerace, 1985; Courvalin *et al.*, 1992)

### *Vápenaté ionty*

Mezi významné signální molekuly většiny buněk se řadí vápenaté ionty  $\text{Ca}^{+2}$ . Hojně jsou zastoupeny v mnoha organelách savčích oocytů – v Mtch, v karyoplasmě, nebo na povrchu lipidových molekul (Petr *et al.*, 2001). Přítomnost vápníku je nezbytná jak po celou oogenezi, kdy je přechod mezi dvěma meiotickými děleními regulován pulzačním nárůstem koncentrace  $\text{Ca}^{+2}$ , tak i na počátku fertilizace a v embryogenezi, jelikož stojí za aktivací raného embrya (Vitullo & Ozil, 1992). Vápenaté ionty se do cytosolu dostávají dvěma specializovanými druhy kanálů, kterými jsou inositol-1,4,5-trifosfátové receptory ( $\text{IP}_3\text{r}$  - Inositol trisphosphate receptor) a ryanodinové receptory (Ryr) (Petr *et al.*, 2002). Dále bylo zjištěno, že oscilace  $\text{Ca}^{+2}$  má vliv na znovuzahájení meiózy a to tím způsobem, že inhibuje AC, která tím pádem nemůže cyklizovat ATP na již zmiňovaný cAMP. Opět tedy dojde ke snížení hladiny cAMP a tím pádem i k prolomení meiotického bloku (Horner *et al.*, 2003). U prasat zvyšování koncentrace vápníku v cytosolu nastává dvě hodiny před GVBD (Kaufman & Homa, 1993)

### *MPF (metaphase promoting factor)*

Dalším v řadě regulátorů meiotického zrání je MPF faktor. Strukturně se jedná o proteinový heterodimer složený z cyklin dependentní kinázy 1 (CDK1 – cyclin dependent kinase 1, známá také jako  $\text{p}34^{\text{cdc}2}$ ) a regulační podjednotky cyklinu B (Sorensen *et al.*, 1985; Maller *et al.*, 1989). Výčet jeho funkcí je dlouhý, nicméně markantní význam má například při kondenzaci chromatinu, při tvorbě DV, při iniciaci segregace chromozomů, nebo v navození GVBD tím, že se podílí na fosforylaci laminů a tedy i na rozpadu jaderné membrány. Většina mechanismů, na kterých se podílí, je regulována právě jeho kinázovou aktivitou (Masui & Markert, 1971). Aktivace MPF je zajištěna defosforylací CDC25B fosfatázou na threoninu 14 (T14) a tyrosinu 15 (Y15) a inhibice probíhá na stejných místech, za pomoci kináz Wee/MYT1 (G2 Checkpoint Kinase/Myelin Transcription Factor 1), které tato místa fosforují (Norbury & Nurse, 1992). Fosforylace

a tedy i inhibice T14 a Y15 je iniciována po asociaci CDK1 s cyklinem B, což nastává během růstové fáze oocyty (Kikuchi *et al.*, 2000). Inaktivovaný MPF je označován jako pre-MPF a je hojně zastoupen v oocytech s ukončeným růstem. V období růstu obecně dochází k navýšení syntézy obou regulačních podjednotek, díky čemuž má pak dorostlý a meioticky kompetentní oocyt dostatečnou zásobu pro průběh meiotického dělení (Gordo *et al.*, 2001). Kromě CDC25B fosfatázy (cell division cycle 25 B phosphatase) je pro aktivaci MPF zapotřebí i dalších regulátory. Samotná CDC25B je regulována činností PKA a také polo-like kinázou 1 (Plk1), která je také spojována s tvorbou a organizací DV (Baran *et al.*, 2013, 2016; Solc *et al.*, 2015). Na mechanismu aktivace pre-MPF se Plk1 podílí podněcováním přesunu cyklinu B z cytoplasmy do jádra (Pines & Hunter, 1994; Hagting *et al.*, 1999; Anger *et al.*, 2003). K hladkému průběhu meiózou je třeba ustanovení rovnováhy mezi degradací a syntézou cyklinu B. APC (anaphase promoting complex, komplex podporující anafázi) umožní navázání ubiquitinu na cyklin B a ten je pak rozpoznán a degradován proteazomem při přechodu z metafáze do anafáze. APC je enzymatický komplex s ubiquitin-ligázovou aktivitou a mimo cyklinu B degraduje například i transkripční represory genů důležitých pro meiotické dělení (Mallory *et al.*, 2007).

### *CSF (cytostatic factor)*

Protikladně oproti APC funguje CSF faktor. Nachází se v cytoplasmě ovulovaných oocytů kde brání degradaci cyklinu B a tím pádem umožňuje zastavení meiotického dělení v metafázi II. Částečně se tedy podílí na udržení II. meiotického bloku, kterému se také někdy říká CSF blok. Na rozdíl od ostatních regulačních faktorů, CSF není charakterizován jednou konkrétní molekulou, ale spíše je definován jako skupina faktorů schopných inhibovat buněčné dělení. Složkou CSF je již dříve zmiňovaný protein Mos, produkt proto-onkogenu *c-mos* (Sagata *et al.*, 1989), který řídí aktivitu i ostatních faktorů meiotického zrání, jako je například MAPK, MEK a p90rsk (Gotoh *et al.*, 1995; Gebauer & Richter, 1997; Gross *et al.*, 1999). Předpokladem také je, že všechny kaskády zahrnující CSF faktory vedou k pozastavení meiotického zrání. Iniciují inhibici APC a tím zabraňují degradaci cyklinu B a snižování koncentrace MPF (Vorlaufer & Peters, 1998). Konkrétními inhibitory APC komplexu jsou Emi1 (early mitotic inhibitor 1) a Erp1/Emi2 (emi-related protein 1) (Reimann & Jackson, 2002). Samotná inhibice je zprostředkována proteinovým mediátorem Cdc20 (cell-division cycle protein 20).

Syntéza Emi1 probíhá během S fáze (Reimann *et al.*, 2001) a v momentě kdy je třeba, aby byl oocyt z meiotického bloku II uvolněn, začnou být tyto inhibitory systematicky a organizovaně destruovány a může být dokončeno druhé meiotické dělení (Tung *et al.*, 2005)

### *Steroidní hormony*

Hormony v buňce působí zejména dvěma mechanismy – genomicky skrze regulaci genové transkripce přes specifické receptory přímo nasedající na sekvence DNA (Nawaz *et al.*, 1992) a negenomicky vazbou na specifické membránové receptory, které zprostředkují spuštění dalších konkrétních signálních kaskád prostřednictvím sekundárních posílů (Morley *et al.*, 1992). Odpověď na genomický mechanismus trvá rámcově několik hodin, na rozdíl od negenomické odpovědi, která je aktivovaná během několika minut po vazbě ligandu.

Mimo steroidní hormony vývoj oocyту ovlivňují i gonadotropiny LH a FSH. Ve folikulu se FSH váže na receptory umístěné na granulózních buňkách a působí cestou cyklické adenosinmonofosfát-dependentní proteinkinázy. LH podporuje růst folikulů tím, že poskytuje substrát pro aromatázu granulózních buněk a spouští obnovení zrání oocytů prostřednictvím preovulačního nárůstu LH. Bylo však prokázáno, že na oocytech nejsou přítomny žádné LH ani FSH receptory a veškerý vliv hormonů je zprostředkován přes granulózní a kumulární buňky (Dekel *et al.*, 1981).

Jedním ze steroidních hormonů je například progesteron, který je produkován kumulárními buňkami. Jeho koncentrace jsou regulovány činností LH a FSH jak u lidských, tak u prasečích oocytů (Chian *et al.*, 1999). Po vlně LH dochází k výraznému zvýšení hladiny progesteronu, což je také moment vystoupení oocyту z meiotického bloku (Coskun *et al.*, 1995; Chian *et al.*, 1999). Progesteron pravděpodobně působí i v oblasti mezibuněčných spojů mezi kumulárními buňkami a oocytem. Ukazuje se, že snižuje expresi connexinu 43, který se podílí na tvorbě mezibuněčných spojů. V případě, že dojde ke snížení množství mezibuněčných spojů mezi oocytem a přiléhajícími buňkami, dojde i k poklesu koncentrace cAMP, což vede k obnovení meiózy (Shimada & Terada, 2002).

Dalším steroidním hormonem je E2 (Allen & Doisy, 1983), který je produkován granulózními buňkami pod vlivem FSH. Může být krevním oběhem distribuován do dalších orgánů (děloha, prsní žlázy, hypothalamus atd.), nebo působí lokálně, v oblasti folikulu. Má podobné účinky jako progesteron: stimuluje folikulogenezi, reguluje tvorbu mezibuněčných spojů mezi kumulárními buňkami a oocytem, podporuje expresi receptorů pro gonadotropiny v granulózích buňkách a inhibuje jejich apoptózu, podílí se na tvorbě žlutého tělíska (Rosenfeld *et al.*, 2001).

### **Vybrané markery meiotického zrání**

Meiotické zrání je souhrn mnoha klíčových dějů, které mají za úkol zajistit komplexní a úspěšný vývoj oocyty, aby následně mohlo dojít k oplození a vzniku životaschopného embrya.

#### *Dynamika vybraných cytoskeletárních struktur*

Meiotické zrání je charakteristické značnou dynamikou cytoskeletárních struktur. Jedním z nepostradatelných dějů, jež se významně podílí na úspěšném dokončení zrání a tvorbě haploidní, oplození schopné samičí gamety je proces tvorby DV a napojování MT k chromozomům. Tento proces se může v závislosti na přítomnosti centriol mezi jednotlivými druhy savců lišit. Centrioly jsou párové buněčné struktury, které spolu s pericentriolárním materiálem (PCM), tvořeným převážně centrosomálními proteiny jako je  $\gamma$ -tubulin nebo NuMA (jaderný protein mitotického aparátu - nuclear mitotic apparatus protein), tvoří centrosomy. Centrosomy jsou nemembránové organely, které jsou považovány za jedny z nejvýznamnějších zástupců MT organizujících center (MTOC – microtubule organising center) a jsou nezbytné pro přenos buněčných signálů nebo translokaci buněčných organel (Manandhar *et al.*, 2005).

U myších oocytů jsou centrosomy přítomné v časně fázi růstu oocyty, postupně dochází k jejich eliminaci a po obnově meiotického zrání již nejsou přítomny. V průběhu meiotického zrání však oocyty zachovávají přítomnost PCM rozptýleného po cytoplazmě a z něj jsou formovány acentriolární centrosomy (acentriolární MTOC), jejichž činností se během metafáze I utváří DV nezávisle na chromozomech (Calarco, 2000; Miyano *et al.*, 2007). Počet MTOC narůstá od diakineze po metafázi I, přičemž během pozdní diakineze je malý podíl MTOC lokalizovatelný v cytoplazmě, mimo chromozomální

oblast, většina MTOC je však asociována s chromatinem, odkud jsou následně vysílány MT DV (Messinger & Albertini, 1991; Manandhar *et al.*, 2005).

U lidských a prasečích oocytů jsou centrozomy v průběhu růstu také eliminovány, nezachovávají však PCM pro vytvoření MTOC v průběhu zrání. Během pozdní diakineze vytvoří bivalenty chromozomů shluky a MT DV jsou náhodně orientovány a uspořádány kolem těchto shluků. Za úspěšnou organizaci MT bez přítomnosti centrosomů nebo MTOC je pravděpodobně zodpovědný MT organizující faktor (MNF; microtubules – nucleated factor), jehož součástí je  $\gamma$ -tubulin (Sathananthan *et al.*, 2006; Schatten *et al.*, 2019). MT jsou v této fázi asociovány s NuMA, který se však postupem zrání vzdaluje od kondenzovaných chromozomů a ukotvuje MT na záporných pólech DV. NuMA také usnadňuje zesíťování MT meiotického DV, čímž napomáhá organizaci a stabilizaci pólů DV od rané mitózy až po anafázi (Alvarez Sedó *et al.*, 2011). Tvorba metafázního DV metafáze I je tedy anastrální, plně závislá na chromozomech, s absencí centriol, nebo MTOC (Alvarez Sedó *et al.*, 2011; Schatten & Sun, 2011).

DV je vystavěno z MT vláken, jež jsou tvořena globulárním proteinem tubulinem, konkrétně dvěma jeho typy -  $\alpha$ -tubulinem a  $\beta$ -tubulinem. Ty vytváří heterodimery skládající se na sebe vždy v jednom směru, čímž vzniká vlákno MT - protofilament. MT je následně definován jako dutý útvar skládající se z třinácti protofilament, která naléhají těsně na sebe. Polymerace či disociace jednotlivých podjednotek tubulinu je možná pouze na koncích vlákna. O rostoucím konci vlákna se hovoří jako o „plus“ konci a na jeho vrcholu je přítomen  $\beta$ -tubulin, zatímco na zkracujícím se konci vlákna (na „minus“ konci), bychom našli  $\alpha$ -tubulin. Správná a bezchybná organizace tubulinových filament je stěžejní pro optimální meiotické zrání, zejména pak pro segregaci chromozomů (Mitchison & Kirschner, 1984; Hirano, 2015; Severson *et al.*, 2016).

$\gamma$ -Tubulin, který byl objeven jako třetí člen tubulinové nadrodiny před více než 30 lety (Oakley & Oakley, 1989), je nyní považován za nepostradatelnou součást nukleačního aparátu, která přispívá k nukleaci a organizaci MT struktur u všech eukaryot. Na rozdíl od  $\alpha$ -tubulinu a  $\beta$ -tubulinu se neintegruje do stěny MT, ale váže se pouze na jeho minusový konec. Jak již bylo popsáno, je součástí MNF, který je zodpovědný za formování DV v prasečím oocyty. Nedávná studie vědeckého týmu Chen *et al.* (2021) prokázala, že mimo jiné v oblasti DV asociuje s enzymem histon-deacetylázou 8

(HDAC8 - Histone deacetylase 8), která sehrává roli v sestavování DV, dynamice  $\gamma$ -tubulinu, stabilitě MT a je nezbytná pro meiotické zrání prasečích oocytů.

Jedním z dalších důležitých kroků při tvorbě DV je jeho bipolarizace. Sestavení pólu DV vyžaduje svazování paralelních MT pomocí propojujících proteinů a také stabilizaci/ukotvení konců MT v oblasti pólu DV pomocí proteinů lokalizovaných na minusových koncích. Jedním z těchto pomocných proteinů je například molekulární motor KIFC1 (kinesin superfamily protein C1), který zajišťuje zejména stabilitu DV (So *et al.*, 2022). Při sestavování DV hraje roli i čas, delší doba utváření DV je často spojována s vnitřní nestabilitou DV a abnormálními vazbami mezi kinetochorem a MT, které podporují chyby v segregaci chromozomů (Holubcová *et al.*, 2015)

### *Dynamika chromatinu*

Na vývoji savčích oocytů, průběhu meiotického zrání a časném embryonálním vývoji se zásadně podílejí také epigenetické modifikace (EM) nukleozomů, základních strukturních jednotek jaderného chromatinu, které jsou tvořeny vláknem DNA namotaným na histonové proteiny. Jádro nukleozomů je tvořeno oktamerem sestaveným ze dvou kopií čtyř histonů (H2A, H2B, H3 a H4), které jsou linkerovým histonem H1 spojeny do kompaktní formace tvořící globulární domény, které následně tvoří struktury vyššího řádu (Luger *et al.*, 1997). Dynamika EM nukleozomů ovlivňuje přístupnost sekvence nukleotidů ke genové transkripci a tím zajišťuje fyziologický průběh meiotického zrání a časný embryonální vývoj (Niemann & Wrenzycki, 2000; Kageyama *et al.*, 2007). EM tak představují nezbytnou složku mechanismu, jež řídí organizaci a interpretaci informací o genomu daného organismu a mohou fungovat na dvou úrovních – může být modifikováno přímo vlákno DNA, nebo dochází k modifikaci histonových proteinů. Pro označení všech epigenetických úprav napříč genomem se používá termín „Epigenom“ (Waddington, 1942).

Jednou z nejvýznamnějších EM vlákna DNA je jeho methylace, jež se významně podílí na regulaci transkripčních mechanismů, jako je například genomový imprinting nebo inaktivace chromozomu X. Významný podíl má i na „obraně genomu“ spojené s umlčením parazitických retrotransposonů (Yoder *et al.*, 1997) a na udržování strukturální integrity chromozomů a prevenci chromozomálních přestaveb (R. Z. Chen *et al.*, 1998).



Nejvýznamnější formou methylace u savců je symetrická methylace cytosinu v pozici 5' v CpG (cytosin trifosfát deoxynukleotid – fosfodiester – guanin trifosfát deoxynukleotid) dinukleotidech (Cooper & Krawczak, 1989), které se vyskytují v CpG ostrovech – oblastech bohatých na CpG dinukleotidy (Bird *et al.*, 1985).

Počátek vývoje PGC savců je specifický dvoufázovou celogenomovou demethylací. PGCs vstupují do vyvíjejícího se zárodečného hřebene a začínají diferenciaci a expanzi. V tomto okamžiku vysoce methylované PGCs podléhají rychlé demethylaci na celogenomové úrovni. V podstatě se jedná o přeprogramování či resetování genomu, zahrnující delecii specifických „značek“ pocházejících od konkrétního rodiče – demethylace imprintovaných oblastí s alelově specifickou genovou expresí (E. Li *et al.*, 1993; Tucker *et al.*, 1996). Druhá fáze methylačního přeprogramování nastává mezi oplodněním oocyту a formováním blastocysty. Nejprve je hned po oplození patrná rychlá paternálně specifická asymetrická demethylace, která probíhá v nepřítomnosti replikačního či transkripčního mechanismu a nazývá se aktivní (Mayer *et al.*, 2000). V momentě, kdy se zygota začne dělit, dojde k poklesu maternálně specifických methylocí, který trvá až do stádia moruly (Dean *et al.*, 2001). K tomuto poklesu dochází v důsledku nepřítomnosti primární DNA methyl transferázy (Dnmt1 – DNA methyl transferase 1) během replikace DNA a mluvíme zde o pasivní demethylaci. Na nově vznikajícím vlákně tudíž nedochází k methyloci *de novo* a hladina methylcytosinu v jádře klesá (Rougier *et al.*, 1998).

EM histonových proteinů zahrnují posttranslační nahrazení jejich - COOH a - NH<sub>2</sub> konců buď svými odlišnými variantami, nebo mohou být modifikovány prostřednictvím methylace, fosforylace, ubiquitinace, sumoylace, biotynylace či acetylace. Některé z těchto typů modifikací se navíc mohou násobit, což výrazně zvyšuje komplexnost EM. Tímto způsobem je možné regulovat stav chromatinu a vytvářet specifický „histonový kód“ (Margueron *et al.*, 2005). Jednou z nejvýznamnějších modifikací histonových proteinů je methylace. Vyskytuje se většinou na podjednotkách oktameru H3 a H4, konkrétně na zbytcích lysinu a argininu a projevuje se zejména v raném embryonálním vývoji, konkrétně v transkripční represi a aktivaci. Methylové skupiny jsou k histonům připojovány enzymy z rodiny methyl – histontransferáz (HMT) (D. Chen *et al.*, 1999). Obecně mají methylace histonů funkci buď aktivátorů, nebo represorů genové transkripce. Markantní význam má methylace například v průběhu meiotického

pachytene, kde ovlivňuje expresi genů souvisejících s meiotickým zráním (De La Fuente *et al.*, 2016). Trimethylace na histonu H3 – H3K4me3 a H3K27me3, mají specifický význam především pro regulaci genové exprese během vývoje nového organismu. V embryonálních buňkách jsou součástí bivalentního chromatinového systému, v němž jsou oblasti DNA současně označeny aktivačními (H3K4me3) a represivními (H3K27me3) histonovými methylacemi (Vastenhouw & Schier, 2012). Předpokládá se, že to umožňuje flexibilní systém genové exprese, v němž jsou geny primárně potlačeny, ale mohou být rychle exprimovány díky H3K4me3, jak buňka postupuje vývojem. Tyto oblasti se obvykle shodují s geny transkripčních faktorů exprimovaných v nízkých hladinách, jako například *Hox* (Homeobox) geny, které jsou nezbytné pro řízení vývoje a buněčné diferenciaci během časně embryogeneze (Bernstein *et al.*, 2006).

V rámci meiotického zrání jsou důležitým markerem asociovaným s chromatinem dvojité zlomy na vlákně DNA (DBS – DNA double-strand breaks), které mohou být způsobeny jak exogenními, tak endogenními faktory. V případě výskytu DBS je oocyt ohrožen mnoha riziky, např. narušením plynulého průchodu meiózou (Marangos & Carroll, 2012), fragmentací chromozomů či vyšším sklonem k apoptóze (Kerr *et al.*, 2012). DBS jsou také spojovány s opožděným rýhováním a menším vývojovým potenciálem raných embryí (Bohrer *et al.*, 2015). Při výskytu DSB je histon H2A.X fosforylován na serinu 139 na  $\gamma$ -H2A.X a vytváří v těchto místech ohniska. Z toho důvodu se fluorescenční značení  $\gamma$ -H2A.X používá jako marker pro označení míst DBS (Ding *et al.*, 2017). Dalším způsobem detekce DBS je například enzymatické značení 3'-OH konce DNA dUTP-fluorescein-isothiokyanátem pomocí terminální deoxyribonukleotidtransferázy (TdT) Buňky takto značené lze následně detekovat pomocí fluorescenční mikroskopie nebo průtokové cytometrie (Rohwer & Azam, 2000).

## 2.2 Reprodukčně toxické látky

V životním prostředí se nachází velké množství látek přírodní či syntetické povahy které mohou mít vliv na živé organismy. Tyto látky nemusí být vždy dostatečně prozkoumané a jejich závadnost je až nějakou dobu po tom, co jsou lidmi využívány. V případě, že se nějaké negativní účinky vyskytnou, dojde k přezkoumání dané látky a následně je zvažováno další její použití. Často sem spadají látky s endokrinně disruptivní aktivitou. Endokrinně disruptivní efekt způsobuje narušení hormonální bilance organismů,

látky které do této skupiny spadají, mimikují působení tělu přirozených hormonů a mohou způsobovat závažné problémy v organismech savců (Colborn *et al.*, 1993). Významným rizikem těchto látek je jejich možný negativní dopad na reprodukční soustavu živočichů, zejména pak savců, včetně člověka (International Programme on Chemical Safety, 2002).

Trvalo několik let od objevení substancí s endokrinně disruptivním efektem, než bylo vydáno oficiální stanovisko Endokrinní společnosti USA (Endocrine Society of the US), které ustálilo definici těchto látek. Theo Colborn totiž již v roce 1991 poprvé použila pojem endokrinní disruptor (ED), v závislosti na výsledcích výzkumu jejího týmu, kde identifikovali látky vyskytující se v prostředí kolem člověka a ostatních živočichů, které mají schopnost vstupovat do organismu a působit na hormonálně řízené soustavy (Colborn & Clement, 1992). Oficiální definice Endokrinní společnosti USA z roku 2008 tedy zní: "Endokrinní disruptory jsou exogenní činitelé, kteří zasahují do syntézy, sekrece, transportu, metabolismu vazby nebo eliminace přirozených krevních hormonů, které jsou přítomné v těle a jsou zodpovědné za udržování homeostáze, reprodukce, vývinu a/nebo chování organismu" (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

ED jsou všudypřítomné po celém světě v různých formách (Mnif *et al.*, 2007; Martyniuk *et al.*, 2020). V několika zemích je již využívání řady EDs zakázáno pro jejich toxicitu a možnou kontaminaci prostředí. Detoxikační enzymy xenobiotik mohou ED metabolizovat nebo rozkládat na menší sloučeniny, avšak přítomnost ED může v životním prostředí přetrvávat, což by mohlo být pro životní prostředí a člověka velmi škodlivé (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Sifakis *et al.*, 2017). EDs jsou také vysoce heterogenní skupinou látek zahrnující mnoho dalších podskupin, jako například drogeristické potřeby (lysmeral, triclosan...) pesticidy (vinclozolin, dichlorodiphenyltrichloroethane...), monomery plastů (bisfenoly), léčiva (diethylstilbestrol), změkčovače plastů (ftaláty - diethylhexylftalát), fytoestrogeny (genistein) a další.

Chronická expozice ED může narušit vývoj endokrinních tkání a reprodukčního systému. Mezi zdokumentované nepříznivé účinky ED na reprodukční systém patří neplodnost, rakovina, snížená kvalita spermatu, kryptorchismus a hypospadié (Van den Belt *et al.*, 2002; Gibson & Saunders, 2014). ED mají přímý vliv jak na vývoj spermií (Li

*et al.*, 2011; Knez *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2019) a oocytů (Mok-Lin *et al.*, 2010), tak i na následný embryonální vývoj lidí (Xiao *et al.*, 2011; Cabry *et al.*, 2020). Dalším příkladem je studie prokazující, že ženy vystavené působení některých pesticidů zařazených do kategorie EDs (např. atrazinu, lindanu a manebu) mají zvýšené riziko dlouhých menstruačních cyklů nebo anovulace (Farr *et al.*, 2004). Navíc způsob expozice, frekvence, dávkování a genotypové charakteristiky exponovaných subjektů jsou zásadními faktory určujícími toxicitu vyvolanou ED (Sifakis *et al.*, 2017).

U EDs byl popsán také transgenerační efekt (Susiarjo *et al.*, 2015; Rattan & Flaws, 2019). Cesty expozice pro vícegenerační a transgenerační účinky se však liší mezi pohlavími. Pokud je samice z filialní generace (F0) březí a vystavená působení EDs, její potomci, kteří jsou generací F1, jsou vystaveni působení EDs přímo v děloze. Generace F2 je vystavena jako zárodečné buňky v rámci generace F1, která se vyvíjí během těhotenství. Účinky EDC pozorované u generací F1 nebo F2 se považují za vícegenerační. Generace F3 je první generací bez přímé expozice EDC, takže tato expozice by se považovala za expozici předků a účinky by se považovaly za transgenerační. Naproti tomu, když jsou EDC vystaveni samci F0 nebo samice F0, které nejsou březí, účinky vzniklé v generaci F1 se považují za multigenerační díky expozici v zárodečné linii a účinky v generaci F2, první generaci, která není přímo vystavena, se považují za transgenerační povahy (Skinner, 2008, 2014; Xin *et al.*, 2015).

Mnohé z nejlepších souvislostí mezi expozicí EDs a nepříznivými zdravotními následky pocházejí ze studií vysokých dávek po průmyslových haváriích a farmaceutických látek s neočekávanými nepříznivými zdravotními následky. Jedním z takových je například výbuch chemického závodu v italském Sevesu v roce 1976 (Pesatori *et al.*, 2003; Eskenazi *et al.*, 2004). Podobným příkladem expozice vysokým dávkám spojeným s nepříznivými zdravotními následky jsou ženy vystavené syntetickému farmaceutickému estrogeneru diethylstilbestrolu (DES) během těhotenství (Herbst *et al.*, 1971; McLachlan, 2006; Titus-Ernstoff *et al.*, 2006). Na rozdíl od těchto expozic vysokým dávkám dochází k typické expozici lidí EDs v nízkých dávkách z reziduí na potravinách, výrobcích osobní péče, čisticích prostředcích pro domácnost, hnojivech a postřicích, obalech potravin a dalších zdrojích. Biomonitorovací studie environmentálně exponovaných osob odhalují koncentrace EDs a dalších chemických látek v krvi a moči (Calafat *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2011). V roce 2002 definovali vědci

NTP (National Toxicology Program) hranici nízké dávky jako dávky v rozmezí typické expozice člověka nebo dávky nižší než dávky testované v tradičních toxikologických hodnoceních (Melnick *et al.*, 2002). Na základě těchto kritérií by každá epidemiologická studie zkoumající osoby exponované v životním prostředí (tj. kdokoli jiný než pracovník exponovaný v zaměstnání) byla definována jako studie nízkých dávek. Profesionální expozice jsou často považovány za "vysoké dávky", a proto jsou zkoumány samostatně. (Brucker *et al.*, 2001; Vandenberg *et al.*, 2012a)

Paradoxem je, že pokud je koncentrace toxického ED v těle vyšší, než je fyziologická koncentrace mimikovaného hormonu, účinek daného ED vymizí úplně, nebo je potlačen či překryt efektem toxickým. Tomuto jevu, kdy ED způsobují horší následky v subtoxických dávkách, než v dávkách vysokých se nazývá „efekt nízké dávky“ (LDF, low dose effect). Z toho vyplývá, že u látek s hormonální aktivitou mohou být pozorovány zcela specifické způsoby působení, které neodpovídají tradičnímu toxikologickému dogmatu, které tvrdí, že se zvyšující se koncentrací látky se zvyšuje její toxicita (Melnick *et al.*, 2002; Vandenberg *et al.*, 2012b). LDF také bývá spojován s tzv. „nemonotónní odezvou“ organismu. Odpověď organismu na expozici EDs je totiž často nelineární, což je opět opak klasické lineární odezvy, kdy s větší koncentrací substance přichází i markantnější efekt. U EDs je možné dosáhnout největšího účinku při nejnižší koncentraci. Odpověď může být také charakterizovaná tzv. „U“ křivkou, kdy největšího účinku lze dosáhnout u nejvyšší a zároveň i nejnižší koncentrace toxické látky a nejnižšího účinku u středních koncentrací (Calabrese & Baldwin, 2001; Vandenberg *et al.*, 2012). Mechanismus vzniku tohoto efektu je spojen s interakcí ligandu (fyziologický hormon, ED) a hormonálního receptoru. EDs mění signály jaderných receptorů v různých organismech dvěma cestami: vytvoření komplexu hormon-receptor, který mění syntézu a metabolismus hormonů, nebo zacílením na specifické proteiny, které řídí transport hormonů v určitém čase a místě (WHO *et al.*, 2013). EDs interagují s receptory jaderných hormonů, včetně estrogenových receptorů  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ , androgenových receptorů, progesteronových receptorů, receptorů štítné žlázy, kortikoidních receptorů a retinoidních receptorů. EDs mají navíc potenciál způsobovat "estrogenicitu", která může cílit na signální dráhu estrogenových receptorů a modifikovat genomickou i negenomickou aktivitu těchto receptorů prostřednictvím přímých interakcí nebo nepřímo prostřednictvím transkripčních faktorů (Kabir *et al.*, 2015). V podstatě dochází k tomu, že EDs fungují vůči tělu přirozeným hormonům agonisticky i antagonisticky, tedy buď

zesilují, nebo zeslabují fyziologické působení hormonů (Calabrese & Baldwin, 2001; Calabrese, 2005).

Pokud jsou jedinci/populace vystaveni působení EDC, je pravděpodobné, že se na vlivu na organismus podílejí i další látky znečišťující životní prostředí, protože kontaminace prostředí je zřídka způsobena jedinou sloučeninou. Kromě toho mohou být účinky různých tříd EDs aditivní nebo dokonce synergické (Crews *et al.*, 2003).

Typickými zástupci endokrinních disruptorů, jsou bisfenoly, konkrétně bisfenol S (BPS - 4,4'-sulfonyldiphenol) a bisfenol A (BPA - 4,4'-(propane-2,2-diyl)diphenol). Navzdory velice rychlému metabolismu těchto látek bylo prokázáno, že BPA i BPS mají závažné negativní dopady zejména na reprodukční zdraví organismů a významné koncentrace byly detekovány v krvi, moči, potu a také ve folikulární tekutině člověka (Genuis *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; González *et al.*, 2019). Závadnost BPA vedla k jeho nahrazení alternativami a jednou z nich byl právě BPS, u kterého byly negativní vlivy popsány o něco později. I přes to je však BPS považován za bezpečnější náhradu díky vyšší stabilitě na slunečním záření nebo obecně při vyšších teplotách. Obě tyto látky byly hojně využívány pro výrobu plastového kuchyňského nádobí nebo v potravinářském průmyslu ve výrobě obalového materiálu potravin (Liao & Kannan, 2013). Používání těchto substancí je díky jejich toxicitě nyní regulováno, nicméně jsou stále obsaženy například v pokladních účtenkách a časopisech (Russo *et al.*, 2017). BPS byl také předmětem zájmu našeho výzkumného týmu, kde v experimentu zkoumajícím jeho vliv na zrání prasečích oocytů byly popsány negativní vlivy projevující se zejména na schopnosti oocytů dokončit meiotické zrání, tvorbě tubulinových vláken DV a expanzi kumulárních buněk (Žalmanová *et al.*, 2017).

### 2.2.1 Lysmeral (2-(4-terc-butylbenzyl)propionaldehyd)

Jedním z aktuálně zkoumaných s potenciálně endokrinně disruptivním efektem je lysmeral (lilial, liestralis, liliový aldehyd), což je syntetický aldehyd používaný například v kosmetice a drogerii (Magnano *et al.*, 2009), který má typickou konvalinkovou vůni (ter Burg *et al.*, 2014). V souladu s Mezinárodní nomenklaturou kosmetických přísad je na spotřebitelských výrobcích uváděn jako butylfenylmethylpropional (Pluym *et al.*, 2016). Lysmeral je považován za látku pravděpodobně narušující endokrinní systém a diskutuje se o něm jako o látce senzibilizující kůži a toxické pro reprodukci. Lysmeral je jednou z

26 vonných chemických látek, které Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitelů (SCCS - Scientific Committee on Consumer Safety) zařadil na seznam kontaktních alergenů (ECHA, 2019; SCCS, 2019) kvůli jejich senzibilizujícím vlastnostem pro pokožku (Uter *et al.*, 2013). V Evropě musí být přítomnost lysmeralu v kosmetických přípravcích uvedena, pokud jeho koncentrace přesáhne 0,001 % v přípravcích, které se nesmývají, jako jsou krémy, pleťové vody a deodoranty, a 0,01 % v přípravcích, které se oplachují, jako jsou mýdla, šampony nebo kondicionéry (European Commission, 2009). Typické množství lysmeralu ve spotřebitelských výrobcích je 1,9 % v parfémeh, 0,6 % ve vodách po holení a až 0,12 % v kosmetice (Pluym *et al.*, 2016). Do těla se lysmeral může dostávat několika cestami: inhalačně, orálně a dermálně, což je nejčastější způsob expozice (Bernauer *et al.*, 2017).

Jednou z metod posuzující vlastnosti, látek využívaných v populaci je biomonitoring (HBM – human biomonitoring). HBM je účinným nástrojem k posouzení expozice lidí chemickým látkám, které ve společnosti vzbuzují obavy. V kombinaci s dotazníkovými údaji a/nebo monitoringem okolí je HBM schopen určit množství a zdroj expozice zkoumaným substancím. Výzkumná skupina Pluym *et al.* (2016) vytvořila plně validovanou kvalitativní metodu HBM lysmeralu LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spektrometry), s cílem pochopit metabolismus lysmeralu v lidském těle a stanovit konverzní faktory, respektive frakční vylučování močí. V klinické studii byly identifikovány čtyři hlavní metabolity, které se po definované perorální dávce vylučovaly močí, a to kyselinu 4-terc-butylbenzoovou (TBBA), lysmerol (LysOH), kyselinu lysmerylovou a kyselinu hydroxy-lysmerylovou (M-11) (Scherer *et al.*, 2017). Tyto metabolity byly metodou LC-MS/MS měřeny v rámci německého průzkumu životního prostředí 2014-2017 (GerES V - German Environmental Survey) s cílem prozkoumat expozici lysmeralu u dětí a dospívajících v Německu. V tomto výzkumu byla analyzována první ranní moč 2133 účastníků ve věku 3-17 let a experiment byl dále doplněn o sběr informací ohledně chování relevantním pro expozici prostřednictvím dotazníků a rozhovorů (Murawski *et al.*, 2020). 99 % vzorků obsahovalo kvantifikovatelné množství specifického metabolitu LysOH, lze vyvodit závěr, že děti a dospívající v Německu byli všudypřítomně vystaveni lysmeralu. Výsledky také ukázaly, že dívky měly vyšší koncentrace metabolitů lysmerolu v moči než chlapci a že používání vonných látek, změkčovadel tkanin a výrobků osobní péče, zejména parfémů s obsahem lysmeralu, bylo pozitivně spojeno s koncentracemi metabolitů lysmeralu v moči (Murawski *et al.*,

2020). V další německé studii Scherer *et al.* (2021) byly metodou LC-MS/MS analyzovány vzorky moči mladých dospělých z Banky environmentálních vzorků (ESB - Environmental Specimen Bank) shromážděných v letech 2000-2018, které poskytla Německá agentura pro životní prostředí (UBA - Umweltbundesamt). Celkem bylo v této studii analyzováno 329 vzorků moči od účastníků ve věku 20 až 29 let (164 pocházejících od žen a 165 od mužů, 24 až 30 vzorků na rok a pohlaví) a opět byl vlastní experiment doplněn o dotazníky týkající se expozice. Byl nastaven spodní limit kvantifikace (LLOQ - lower limit of quantification) na 0.2 µg/L pro všechny metabolity kromě M-11 u které byl LLOQ 0.4 µg/L. TBBA a lysmerol byly nalezeny ve většině studovaných vzorků (99 %, resp. 93 % > LLOQ), zatímco M-11 a kyselina lysmerylová byly zjištěny méně často (44 %, resp. 43 % > LLOQ). Opět zde byla potvrzena korelace mezi používáním přípravků s obsahem lysmeralu a hladinou metabolitů v moči (Scherer *et al.*, 2021). Toxikologická interpretace těchto zjištění je však ztížena vzhledem k tomu, že není k dispozici žádná orientační hodnota založená na zdravotním stavu.

O povaze lysmeralu jakožto ED ještě rozhodnuto nebylo, nicméně dosavadní výzkumy potvrzují podobnost jeho účinků s látkami spadajícími do kategorie EDs. Jednou z jeho alarmujících vlastností je jeho estrogení aktivita. Výzkumy ukázaly, že mnoho chemických látek používaných v přípravcích pro osobní hygienu má estrogení aktivitu a při aplikaci v oblasti prsou by mohly přispívat k rostoucímu výskytu rakoviny prsu u lidí, pokud dostatečné množství pronikne přes kůži do tkání prsu (Darbre *et al.*, 1983; Harvey & Darbre, 2004; Donovan *et al.*, 2007). Pro svou typickou vůni je i lysmeral využíván jako parfémová složka kosmetických produktů, které jsou aplikovány přímo na kůži a jeho estrogení působení prokázal výzkumný tým Charles & Darbre (2009) v experimentu s lidskými MCF7 (Michigan Cancer Foundation-7) buňkami pocházejícími z linie nádoru prsu. Konkrétně zde byla prokázána jeho schopnost regulovat genovou expresi v MCF7 buňkách či zrychlovat jejich růst *In vitro*.

Celkový vliv lysmeralu na fyziologii organismů, jejich reprodukční a endokrinní soustavy je předmětem aktuálně probíhajících výzkumů.



### 3. Hypotéza a cíle práce

Na základě prostudování dostupné odborné literatury byla stanovena hypotéza, podle které lysmeral negativně ovlivňuje meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*. Za účelem ověření hypotézy byly stanoveny cíle:

- Zhodnotit vliv lysmeralu na meiotické zrání prasečích oocytů
- Sledovat a zhodnotit vliv lysmeralu na utváření cytoskeletárních struktur meiotického vřetene
- Sledovat a zhodnotit četnost defektního dělicího vřeténka a chybného napojení tubulinu k pólům DV nebo k chromozomům
- Sledovat a zhodnotit četnost výskytu dvouřetězcových zlomů ve vláknech DNA
- Sledovat a zhodnotit vliv na epigenetický marker – histon H3K4me3

## 4. Materiály a metodika

### 4.1 Chemikálie

- Médium 199 – M199 (Gibco, UK)
- Bovinní fetální sérum (GincoBRL, Life Technologies, Germany)
- Gentamicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Kyselina N'-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2 ethansulfonová - 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)
- Fosfátový pufr - PBS (Phosphate buffered saline) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Azid sodný - NaN<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Kozí sérum ve fosfátovém pufru - NGS (Abcam, Cambridge, UK)
- Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Dimethyl sulfoxid - DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Anti- $\alpha$  tubulin primární protilátka (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- 4'6 – diamidino – 2 – fenylnol dihydrochlorid - DAPI (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Fluorescein-5-izothiokyanát (FITC) konjugovaná Kozí Anti-Myší IgG sekundární protilátka (T6199) (Abcam, Cambridge, UK)
- Anti-H3K4me3 primární protilátka (Abclonal, USA)
- Tetramethylrhodaminem TRITC konjug. Kozí Anti-Králičí IgG sekundární protilátka (ab7766) (Abcam, Cambridge, UK)

## 4.2 Izolace oocytů z ovárií

Oocyty využívané pro experimenty byly získávány z ovárií jatečně poražených prepubertálních prasnic. Z jatek byly vaječníky do laboratoře převezeny v termoláhvi, pro zajištění optimální teploty 38 °C.

Komplexy oocytu a kumulárních buněk (COC – cumulus-oocyte complex) byly získávány metodou aspirace, při které byla injekční stříkačkou (10 ml) s jehlou (10G) odebírána folikulární tekutina z folikulů o velikosti 2-5 mm v průměru. Odebraná tekutina byla následně přemístěna do Petriho misky, odkud byly selektovány oocyty s ukončeným růstem. Při výběru meioticky kompetentních oocytů s ukončeným růstem byly sledovány tyto parametry: homogenní cytoplasma, velikost 120  $\mu\text{m}$  vnitřního průměru oocytu a také nejméně dvě vrstvy kumulárních buněk vytvářejících kompaktní obal.

## 4.3 Kultivace oocytů

Před samotnou kultivací byly vybrané oocyty nejdříve 3x promyty v modifikovaném kultivačním médiu M199, obohaceném o hydrogen uhličitán sodný (0,039 ml 7 % roztoku na 1 ml média), laktát vápenatý (0,6 mg / ml), gentamicin (0,025 mg / ml), HEPES (1,5 mg / ml), gonadotropní hormony eCG a hCG v poměru 13,5 I.U : 6,6 I.U. / ml (P.G.600, Intervet, Boxmeer, Holland) a folikulární tekutinu (100  $\mu\text{l}$  / ml). Následně byly oocyty rozděleny do 4 experimentálních skupin a přeneseny do čtyřjamkové destičky (NUNC, Roskilde, Denmark). Kultivace probíhala po dobu 48 hodin v podmínkách řízené atmosféry o obsahu 5 % CO<sub>2</sub> ve směsi se vzduchem při 39°C. Jedna jamka obsahovala kontrolní oocyty a zbylé tři jamky byly pro oocyty experimentální.

## 4.4 Ošetření oocytů

COCs byly rozděleny do 4 experimentálních skupin, jedné kontrolní, kultivované bez přítomnosti lysmeralu a třech pokusných kultivovaných za přítomnosti lysmeralu o celkových koncentracích: 5 nM, 500 nM a 50  $\mu\text{M}$ . Lysmeral byl rozpuštěn v dimethyl sulfoxidu (DMSO). Finální koncentrace DMSO byla vždy 0,1 %. Oocyty kontrolní skupiny byly ošetřeny pouze 0,1 % DMSO.

## 4.5 Imunocytochemie

### 4.5.1 Lokalizace $\alpha$ -tubulinu

Po ukončení kultivace byly oocyty pipetováním tenkostěnnou kapilárou zbaveny kumulárních buněk. Fixace trvající 30 minut byla provedena v 4 % roztoku paraformaldehydu v PBS (Phosphate buffered saline) za laboratorní teploty. Poté byly oocyty promyty v PBS-NaN<sub>3</sub>. Oocyty byly pro další experiment uchovány při teplotě 4°C. Pro zajištění propustnosti membrán oocytu byla následně provedena permeabilizace v 0,1% tritonu X-100 rozpuštěného v PBS-NaN<sub>3</sub>. 30 minut trvající blokáce proběhla také v Tritonu X-100 rozpuštěného v PBS-NaN<sub>3</sub>, který byl obohacen o NGS o celkové koncentraci 5%. Následně byly oocyty inkubovány za přítomnosti primární protilátky myší anti- $\alpha$ -tubulin (T6199) ředěné (1:1000) v promývacím roztoku (Triton X-100 rozpuštěný v PBS-NaN<sub>3</sub>, obohacen o NGS o celkové koncentraci 1%) po dobu 1 hodiny. Část oocytů byla ponechána bez primární protilátky pro negativní kontrolu. Po inkubaci s primární protilátkou byly oocyty 3x promyty v promývacím roztoku. Promyté oocyty byly kultivovány se sekundární protilátkou kozí anti-myší IgG protilátkou, která byla konjugovaná s fluorescein-5-izothiokyanátem (FITC) ředěná (1:200) v promývacím roztoku. Kultivace se sekundární protilátkou trvala 40 minut, po kterých byly oocyty opět 3x promyty v promývacím roztoku. Nakonec byly oocyty montovány na podložní sklíčko s kapkou Vectashieldu obsahující 4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid (DAPI) pro vizualizaci chromatinu a možnosti stanovit stádia meiotického zrání oocytu.

### 4.5.2 Lokalizace histonu H3K4me3

Po příslušné době kultivace byly COCs zbaveny kumulárních buněk tak, že byly opakovaně pipetovány tenkostěnnou kapilárou. Fixovány byly 30 minut v 4 % roztoku paraformaldehydu v PBS (Phosphate buffered saline) za laboratorní teploty a poté promyty v PBS-NaN<sub>3</sub>, který byl obohacen o NGS o celkové koncentraci 5%. Oocyty byly pro další experimenty skladovány při teplotě 4°C. Permeabilizace a blokáce proběhla v 0,1 % Tritonu X – 100 (v 1 % a 5 % kozím séru ve fosfátovém pufru, NGS – PBS). Dále byly oocyty inkubovány za přítomnosti primární protilátky králičí anti-H3K4me3 (ab7766) ředěnou (1:200) v promývacím roztoku (Triton X-100 rozpuštěný v PBS-NaN<sub>3</sub>, obohacen o NGS o celkové koncentraci 1%) po dobu 1 hodiny. Část oocytů byla ponechána bez primární protilátky pro negativní kontrolu. Po inkubaci s primární protilátkou byly oocyty 3x promyty v promývacím roztoku. Promyté oocyty byly

kultivovány se sekundární kozí anti-králičí IgG protilátkou která byla konjugovaná s Tetramethylrhodaminem (TRITC) a ředěná (1:200) v promývacím roztoku. Kultivace se sekundární protilátkou trvala 40 minut, po kterých byly oocyty opět 3x promyty v promývacím roztoku. Montování na podložní sklíčko bylo za přítomnosti kapky Vectashieldu obsahujícího 4',6 – diamidino – 2 – fenylyndol (DAPI; Thermo Fisher Scientific) pro obarvení chromatinu a možnosti stanovit stádia meiotického zrání oocyty.

## **4.6 Tunel assay**

Pro sledování přítomnosti dvojitých DNA zlomů byla využita metoda TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling). Fixované oocyty MII byly permeabilizovány v 0,1 % Tritonu X-100 v PBS obsahujícím 0,05 % NaN<sub>3</sub> po dobu 40 min. Oocyty byly ošetřeny deoxyuridinosintrifosfátem (dUTP) konjugovaným s fluoresceinem a enzymem terminální deoxyribonukleotidyltransferázou (TdT) (In Situ Cell Death Detection Kit, kat. č. 11684795910, Roche, Německo) po dobu 1 hodiny ve tmě při 37 °C. Pozitivní kontrola byla připravena pomocí soupravy DNase I (AMP-D1, Sigma-Aldrich). Nakonec byly oocyty připevněny na sklíčka pomocí média Vectashield plus 4',6-diamidino-2-fenylyndol (DAPI). Oocyty s pozitivním signálem byly hodnoceny jako tunel pozitivní, oocyty bez signálu jako tunel negativní.

## **4.7 Konfokální mikroskopie a analýza obrazu**

Pro snímání preparátů byl použit konfokální mikroskop Olympus IX83 (Olympus Germany). Nastavení mikroskopu bylo identické pro jednotlivé sledované markery. Pomocí programu ImageJ (National Institutes of Health, USA) byla měřena a hodnocena intenzita fluorescence. Byla vyjádřena jako „relativní intenzita“ získaná poměrem mezi průměrnou naměřenou hodnotou intenzity v oocytech kontrolní skupiny a průměrnou hodnotou intenzity v oocytech dané experimentální skupiny.

## **4.8 Statistická analýza**

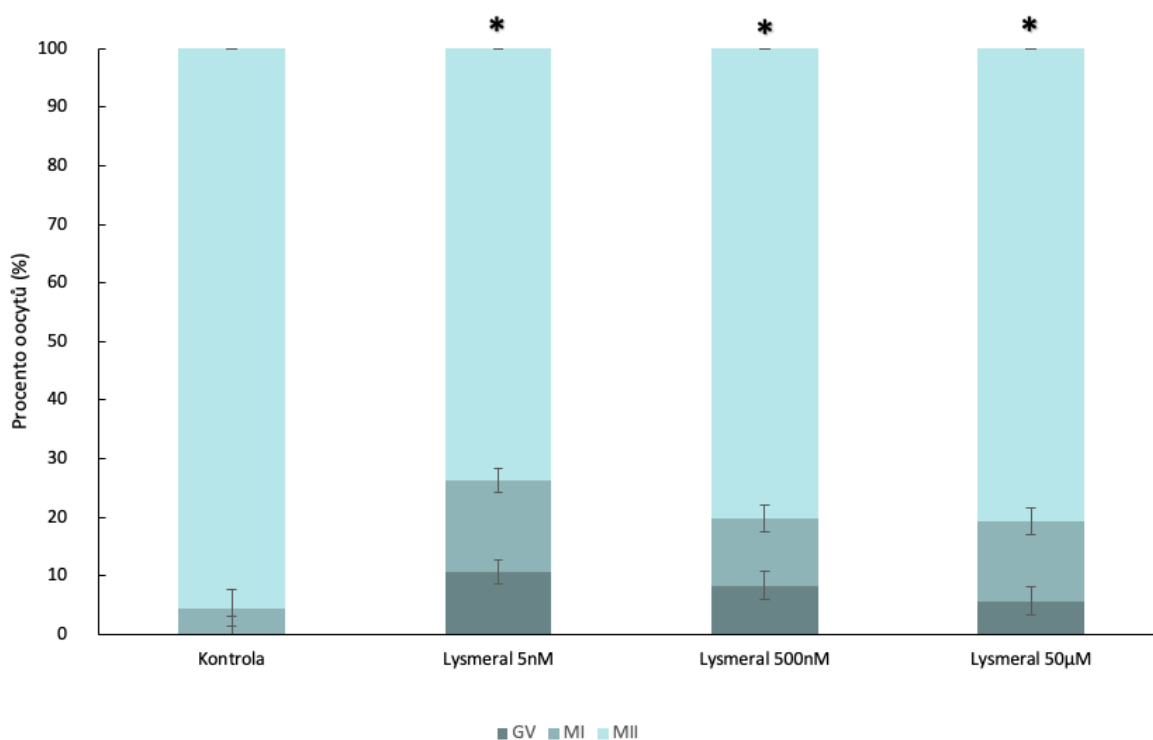
Pro statistickou analýzu porovnávání mezi skupinami byl použit Chí kvadrát test s Bonferroniho korekcí nebo Fischerův exaktní test. Data všech experimentů byla uvedena jako průměr ± střední chyba průměru z minimálně tří nezávislých experimentů. Zpracování dat proběhlo pomocí programu Statistica Cz 12 (StatSoft, Inc., USA). Pokud byla P hodnota menší než 0,05, byl výsledek považován za statisticky významný. Byl

stanoven minimální počet oocytů  $n \geq 15$  a každý experiment zahrnoval minimálně tři nezávislá opakování.

## 5. Výsledky

### 5.1 Vliv lysmeralu na progresi meiotického zrání

Cílem experimentu bylo sledovat vliv tří koncentrací lysmeralu (5 nM, 500 nM a 50  $\mu$ M) na průběh meiotického zrání prasečích oocytů *in vitro*. Oocyty byly s jednotlivými koncentracemi kultivovány po dobu 48 hodin a následně bylo na základě morfologického stavu chromatinu hodnoceno dosažené stádium meiotického zrání. Graf 1 zobrazuje procenta oocytů v jednotlivých fázích. Část oocytů meiotické zrání nedokončila, tedy nedosáhla stádia MII, ale zastavila zrání buď ve stádiu GV nebo MI. Byl pozorován signifikantní rozdíl ve schopnosti dosáhnout stádia MII u oocytů kontrolní skupiny oproti oocytům po expozici lysmeralem. Statisticky významné snížení schopnosti dokončit meiotické zrání do fáze MII bylo pozorováno u všech koncentrací 5 nM, 500 nM a 50  $\mu$ M. Vliv lysmeralu na průběh meiotického zrání se v našem experimentu prokázal být lineárně závislý na dávce.

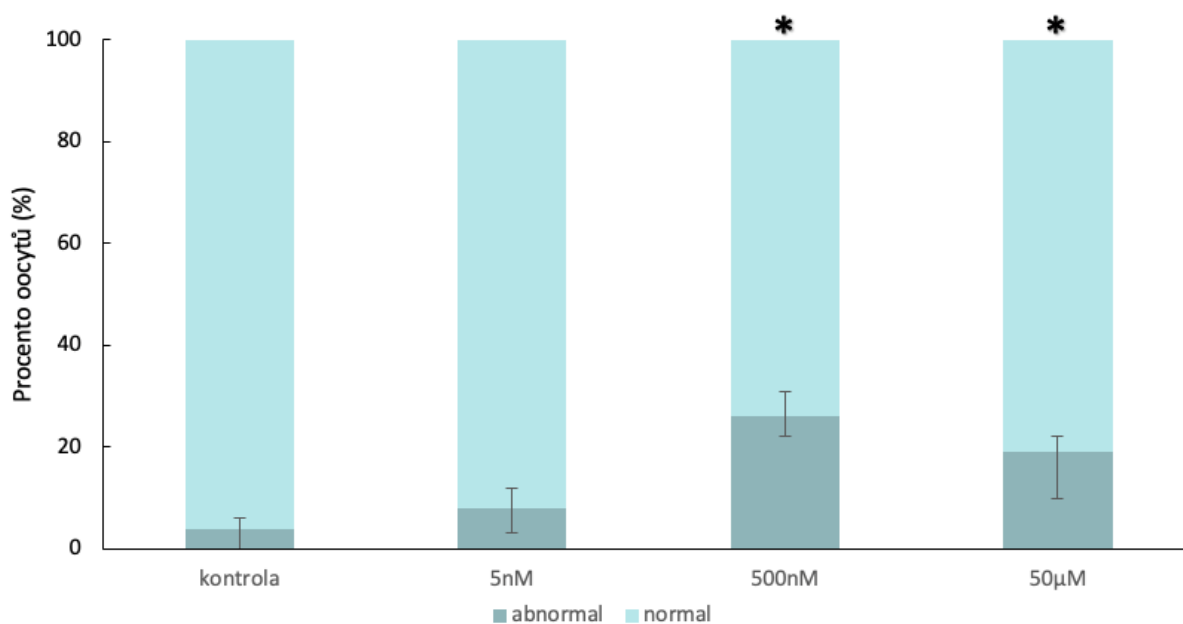


**Graf 1: Efekt lysmeralu na progresi meiotického zrání**

GV – germinal vesicle – oocyt ve stádiu zárodečného váčku, MI – oocyt ve stádiu první meiotické metafáze, MII – oocyt ve stádiu druhé meiotické metafáze. Statisticky významný rozdíl je označen hvězdičkou. Data jsou prezentována jako průměrné procento (průměr  $\pm$  střední chyba průměru) z nejméně tří nezávislých experimentů,  $n \geq 30$  oocytů na skupinu ( $P < 0,05$ ).

## 5.2 Vliv lysmeralu na formaci dělicího vřeténka v průběhu meiotického zrání

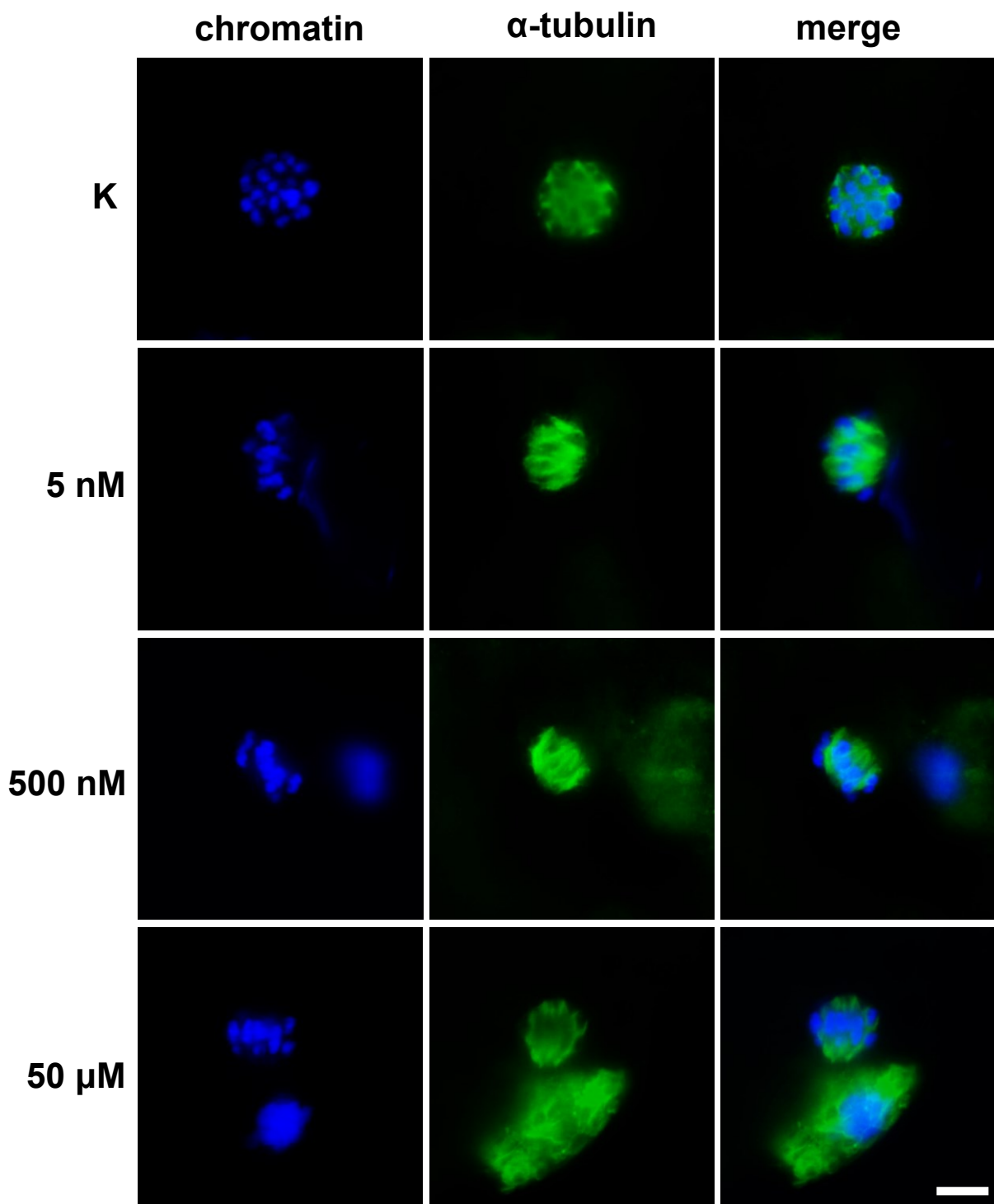
Utváření DV v metafázi II. meiotického dělení u oocytů kultivovaných 48 hodin v in vitro podmínkách za přítomnosti lysmeralu bylo dalším předmětem výzkumu této práce. Posuzována byla morfologie DV a seřazení chromozomů v ekvatoriální rovině na základě imunofluorescenčního barvení DNA a  $\alpha$ -tubulinu. Typická struktura DV a pravidelně seřazené chromozomy byly pozorovány v kontrolní skupině oocytů. Oocyty, které byly ošetřeny jednotlivými koncentracemi lysmeralu vykazovaly vyšší incidenci defektů DV, například jeho výrazně menší velikost, chybné napojení mikrotubulů na chromozomy, nižší hustotu tubulinových vláken či póly DV příliš vzdálené od sebe (obrázek 2). Signifikantní rozdíly byly zaznamenány v testovaných koncentracích 500 nM a 50  $\mu$ M. Ve skupině s nejnižší koncentrací 5 nM nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl výskytu abnormalit DV oocytů oproti kontrolní skupině oocytů (graf 2).



### Graf 2: Vliv lysmeralu na formaci dělicího vřeténka v průběhu meiotického zrání

Statisticky významné rozdíly jsou značeny hvězdičkou ( $P < 0,05$ ). Data jsou prezentována jako průměrné procento (průměr  $\pm$  střední chyba průměru) z nejméně tří nezávislých experimentů,  $n \geq 30$  oocytů ve skupině.



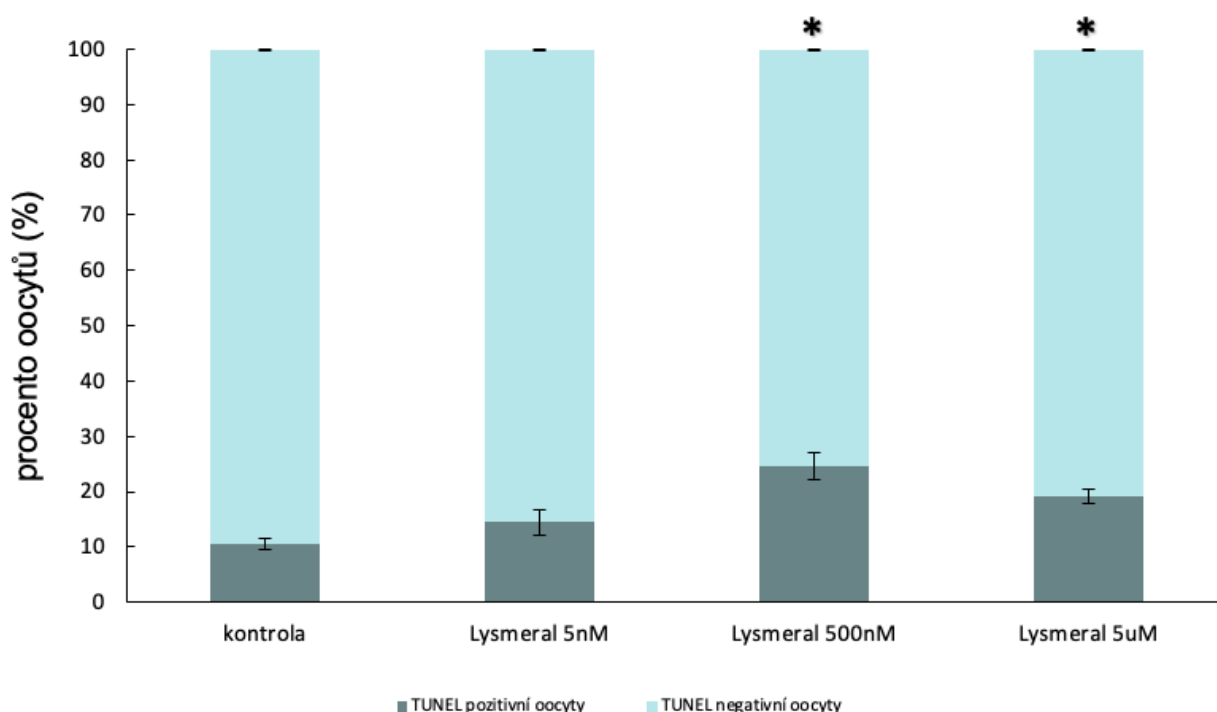


### Obrázek 2: Vizualizace chromatinu a $\alpha$ -tubulinu

Reprezentativní obrázky představují vizualizaci chromatinu (modrá) a  $\alpha$ -tubulinu (zelená) ve třech koncentračních skupinách lysmeralu (5 nM, 500 nM a 50  $\mu$ M) a ve skupině kontrolní (K). Na obrázcích znázorňujících DV u oocytů ošetřených lysmeralem lze pozorovat různé druhy defektů DV. Měřítka u každého obrázku odpovídá 10  $\mu$ M. Sloupec „Merge“ představuje spojení obrazů obou vizualizovaných struktur.

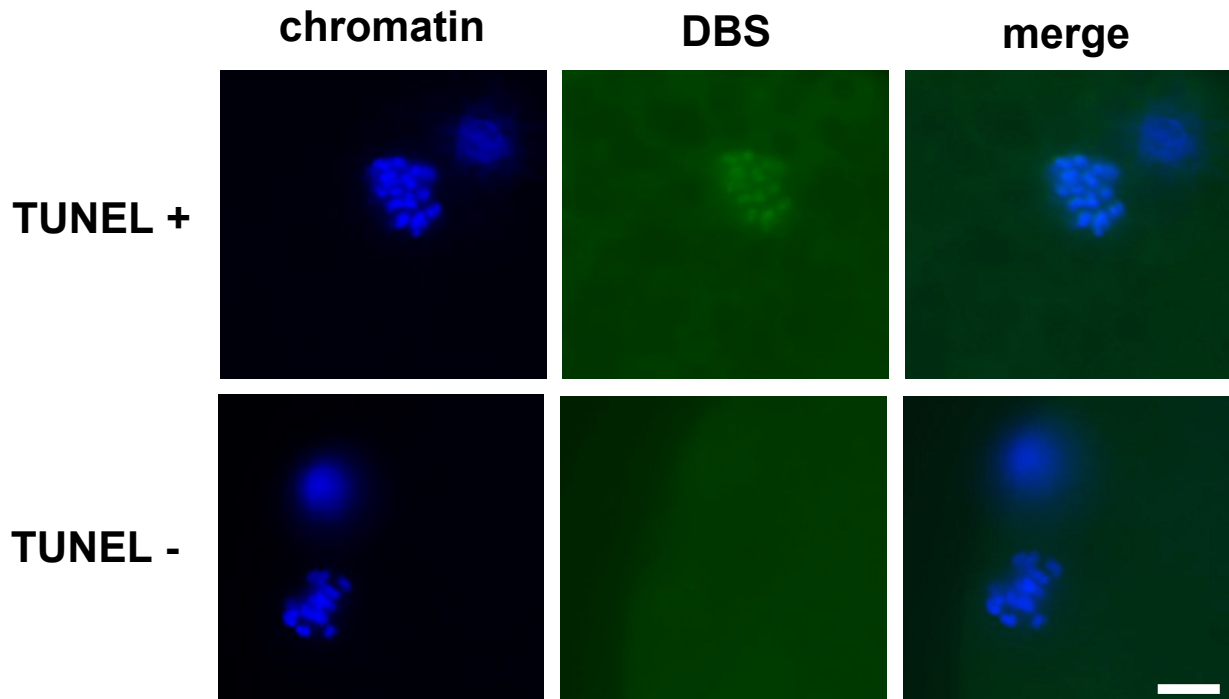
### 5.3 Vliv lysmeralu na integritu chromatinu v průběhu meiotického zrání

Cílem experimentu bylo analyzovat četnost dvouřetězcových zlomů DNA ve skupinách oocytů ošetřených třemi různými koncentracemi lysmeralu (5 nM, 500 nM a 50  $\mu$ M) v průběhu *in vitro* kultivace. Integrita DNA byla posuzována pomocí metody TUNEL, která dvouřetězcové zlomy zaznamenává na základě přítomnosti/nepřítomnosti fluorescenčního signálu (obrázek 3) TUNEL pozitivní signál indukující DNA fragmentaci byl zaznamenán ve všech skupinách oocytů kultivovaných za přítomnosti lysmeralu. Statisticky významné rozdíly byly pozorovány ve skupinách oocytů testovaných koncentrací 500 nM a 50  $\mu$ M (graf 3).



**Graf 3: Vliv lysmeralu na integritu chromatinu v průběhu meiotického zrání**

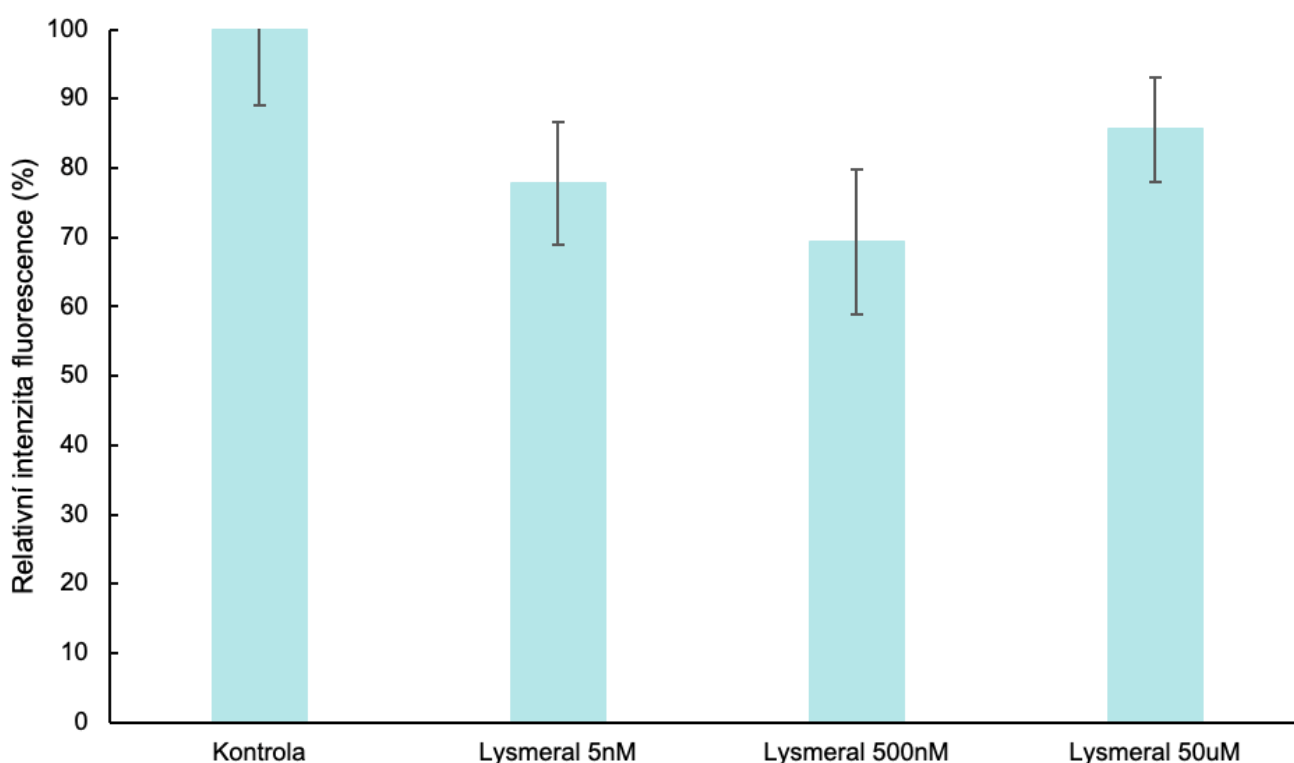
Statisticky významné rozdíly jsou značeny hvězdičkou ( $P < 0,05$ ). Data jsou prezentována jako průměrné procento (průměr  $\pm$  střední chyba průměru) z nejméně tří nezávislých experimentů,  $n \geq 30$  oocytů na skupinu.



**Obrázek 3: Vizualizace chromatinu a dvojitých zlomů DNA analyzovaných metodou TUNEL** Reprezentativní obrázky chromatinu (modrá) a zlomů DNA (DBS – zelená), které byly analyzovány metodou TUNEL První řádek obrázků zobrazuje TUNEL pozitivní oocyt (TUNEL +), druhý řádek obrázků znázorňuje TUNEL negativní oocyt (TUNEL -). Měřítka u každého obrázku odpovídá 10  $\mu$ M. Sloupec „Merge“ představuje spojení obrazů obou vizualizovaných struktur.

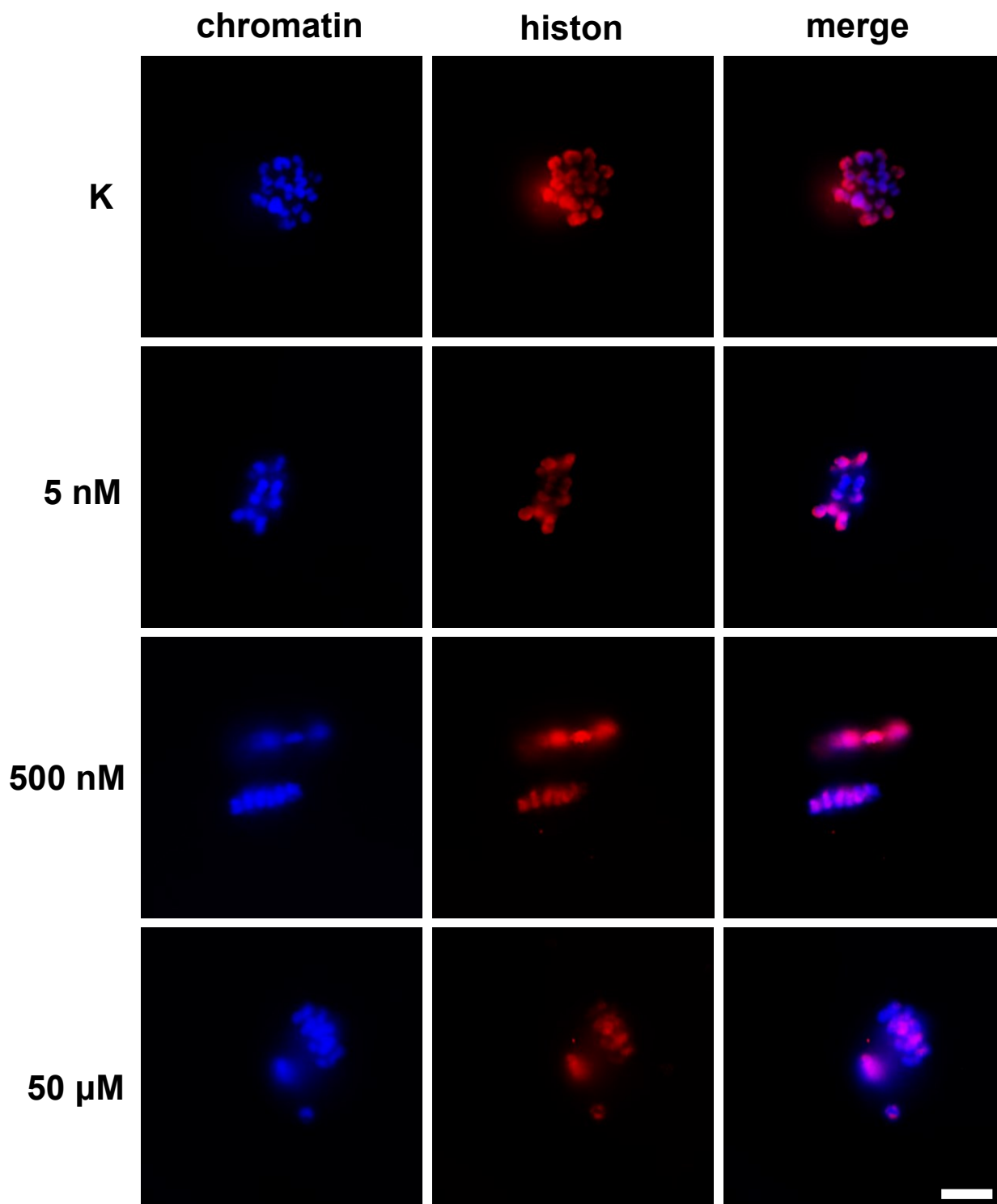
## 5.4 Vliv lysmeralu na změnu v methylaci histonu H3K4me3

Cílem bylo zhodnotit vliv expozice lysmeralu na epigenetické markery heterochromatinu po 48 hodinách in vitro kultivace ve skupinách oocytů ošetřených třemi různými koncentracemi lysmeralu (5 nM, 500 nM a 50  $\mu$ M). Data ukazují snížení intenzity fluorescence ve všech skupinách oocytů kultivovaných s lysmeralem, nicméně statistická významnost nebyla prokázána ani u jedné z koncentračních skupin (graf 4).



**Graf 4: Vliv lysmeralu na změnu v methylaci histonu H3K4me3**

Data jsou prezentována jako průměrné procento (průměr  $\pm$  střední chyba průměru) z nejméně tří nezávislých experimentů,  $n \geq 20$  oocytů na skupinu ( $P < 0,05$ ).



#### Obrázek 4: Vizualizace chromatinu a histonu H3K4me3

Reprezentativní obrázky představují vizualizaci chromatinu (modrá) a histonu H3K4me3 (červená), ve třech koncentračních skupinách lysmeralu (5 nM, 500 nM a 50 μM) a ve skupině kontrolní (K). Měřítka u každého obrázku odpovídá 10 μm. Sloupec „Merge“ představuje spojení obrazů dvou vizualizovaných struktur.

## 6. Diskuze

Cílem předkládané diplomové práce je sledování a popsání vlivu lysmeralu na meiotické zrání prasečích oocytů, konkrétně pak na vybrané proteinové markery a poškození DNA. Prasečí a lidský organismus sdílí mnoho anatomických a fyziologických charakteristik (Groth, 2007), proto jsme jako modelový organismus zvolili prase. Prasečí oocyt se svou fyziologií velmi podobá oocytu lidskému, proto je pro sledování účinku reprodukčně toxických látek na meiotické zrání *in vitro* vhodnějším modelem než často využívaný oocyt myši (Swindle *et al.*, 2012). Pro náš experiment byla stěžejní podobnost zejména v oblasti reprodukce, oogeneze a raného embryonálního vývoje. Významné shody jsou například v aktivaci embryonálního genomu, která u lidí nastává ve stádiu 4 buněk a u prasete ve 4-8 buněčném embryu, v načasování meiotického zrání či v dosažení stádia blastocysty (Wehrend & Meinecke, 2001).

Denní příjem lysmeralu i přítomnost hlavních metabolitů lysmeralu v moči běžné populace již byly stanoveny (Scherer *et al.*, 2017). Lze se domnívat, že pravděpodobnost přítomnosti lysmeralu v dalších tělních tekutinách člověka je vysoká (Murawski *et al.*, 2020; Scherer *et al.*, 2017, 2021) a dochází tak i expozici lidských oocytů. Na základě dostupných informací a předběžných výsledků byly z široké koncentrační řady zvoleny pro následující experimenty tři koncentrace lysmeralu (5 nM, 500 nM a 50  $\mu$ M). Dosud nebyla publikována oficiální studie, která by skutečné koncentrace lysmeralu ve folikulární tekutině stanovila, nicméně díky experimentům sledujícím vliv jiných reprodukčně toxických látek na zrání oocytů (Ding *et al.*, 2017, 2020; Žalmanová *et al.*, 2017) můžeme usoudit, že i skutečná koncentrace lysmeralu ve folikulární tekutině bude těmto hodnotám blízká.

Meiotické zrání oocytů je složitý proces zahrnující velké množství vzájemně propojených signálních drah a faktorů, jejichž narušení může správnou progresi narušit. Podmínkou pro tvorbu vývojově kompetentních oocytů a následně správný embryonální vývoj je právě bezchybnost a plynulost maturačních procesů oocyty (Picton *et al.*, 1998). Výsledky získané po 48hodinové kultivaci oocytů v jednotlivých koncentracích prokazují negativní vliv lysmeralu na průběh buněčného cyklu v procesu maturace oocytů *in vitro*. Po ukončení kultivace byla hodnocena stádia, ve kterých se oocyty nacházely – stádium GV, MI (metafáze prvního meiotického dělení) a MII (metafáze druhého meiotického dělení). Signifikantní množství kultivovaných oocytů v experimentálních skupinách se

však nacházelo ve stádiích GV a MI. Tento efekt byl sledován u všech tří použitých koncentrací lysmeralu (5 nM, 500 nM a 50 µM). Může se jednat o takzvaný nelineární efekt (Vandenberg *et al.*, 2012).

Vzhledem k tomu, že zatím nebyly publikovány studie zkoumající vliv lysmeralu na progresi oocyty meiotickým zráním, nabízí se pouze možnost srovnání s látkami, u nichž byl tento efekt pozorován. Obdobné efekty reprodukčně toxických substancí na oocyty a ženský rozmnožovací systém obecně byly prokázány u mnoha látek, zejména pak u bisfenolů. Srovnatelné výsledky byly popsány v experimentu sledujícím vliv bisfenolu AF na průběh meiotického zrání myších oocytů (Ding *et al.*, 2017). Také u BPS byly popsány podobné efekty po kultivaci prasečích oocytů a statisticky významný efekt byl pozorován v koncentraci BPS 3 nM, což byla zároveň nejnižší koncentrace, tudíž bylo možné uvažovat o „efektu nízké dávky“ (Žalmanová *et al.*, 2017). *In vivo* studie pracující s myšími samicemi, které byly dlouhodobě vystaveny dávkám BPS simulujícími reálný výskyt v prostředí, dospěla k obdobným výsledkům (Nevoral *et al.*, 2018). Stejně tak byl prokázán negativní vliv různých koncentrací BPA na zrání prasečích (Wang *et al.*, 2016) a lidských oocytů (Machtinger *et al.*, 2013). Díky podrobným studiím se ukázalo, že období kolem MI je vůči expozici látkám s endokrinně disruptivním působením vysoce citlivé. Výzkumný tým Can *et al.* (2005), který ve své studii sledoval účinek BPA na myší oocyty v různých fázích meiotického zrání, dospěl k výsledkům, které popisují, že nejvíce oocytů přerušilo meiotické zrání v momentě přechodu z metafáze I do anafáze I. Naproti tomu v následujícím přechodu z anafáze I do telofáze I bylo přerušení meiotického méně časté. Vzhledem k tomu, že jsou z velké části popsány dráhy vedoucí k začátku jak meiotické, tak mitotické anafáze (He *et al.*, 2021), můžeme odvodit potencionální mechanismy působení zmíněných látek. Například bylo prokázáno, že inhibice proteáz je dostačujícím impulzem k tomu, aby byl buněčný cyklus zastaven (Karasu *et al.*, 2019). Počátek anafáze je totiž spojen s degradací cyklinu, kterou zprostředkovává ubiquitin-proteazomový komplex společně s faktory MAPK a MPF (Sun *et al.*, 1999). Jedna z teorií tedy předpokládá, že k zastavení cyklu dochází z důvodu zamezení degradace cyklinu. Naproti výsledkům prokazujícím negativní účinky bisfenolů na progresi oocytů meiotickým zráním stojí i studie s protichůdnými výsledky. Vědci výzkumného týmu Campen *et al.* (2018) nepozorovali abnormality v rámci dosažení MII stádia u kravských oocytů, které byly kultivovány s BPS a BPA. Důvodem může být druhová rozdílnost v citlivosti na endokrinní disruptory.

Vliv lysmeralu na prasečí oocyty jsme v našem experimentu pozorovali také v souvislosti s formováním DV. Abnormality DV byly přítomné ve větší míře ve skupinách oocytů všech tří koncentrací. Konkrétně se jednalo o snížené počty tubulinových filament, menší velikost DV, póly roztažené příliš do stran, chybné napojení chromozomů k filamentům či zploštělost DV. V některých případech se vady přenesly i dále a způsobovaly např. špatné seřazení chromozomů v metafázní figuře. Sledovaný efekt byl lineární, největší incidenci abnormálních vřeten jsme pozorovali ve skupině oocytů kultivovaných při koncentracích lysmeralu 500 nM a 50  $\mu$ M. Defekty v sestavení DV a abnormality v uspořádání chromozomů mohou vést k selhání meiotické progresu a následně ke zhroucení plynulého mechanismu maturace oocyty, což vede buď k chybám typu selhání oplození či aneuploidii, nebo k úplné nefunkčnosti oocyty, jak bylo popsáno ve studiích zaměřujících se na prasečí a myší oocyty pod vlivem BPA (Can *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2016).

Na základě našich výsledků můžeme konstatovat, že lysmeral narušuje tvorbu meiotického vřeténka v prasečích oocytech a způsobuje nepravidelnosti v uspořádání tubulinových vláken. Existuje mnoho dalších exogenních látek, u kterých byl také zaznamenán zvýšený výskyt abnormálních vřeten. Srovnatelný vliv na správné sestavení chromozomů do metafázní destičky *in vivo* (Hunt *et al.*, 2003) a *in vitro* (Can *et al.*, 2005) byl pozorován při zrání myších oocytů v přítomnosti BPA, abnormality meiotického vřeténka byly zřejmě důsledkem narušení kontrolního bodu DV. Také během zrání prasečích oocytů *in vitro* působil BPA obecně negativně na průběh buněčného cyklu, architekturu vřeténka a organizaci chromozomů (Wang *et al.*, 2016). Další látkou z jiné skupiny toxinů ovlivňujících stavbu DV v oocytech je podofylotoxin, který je běžně využíván jako medikament při léčbě genitálních bradavic. Abnormality DV spojené s expozicí podofylotoxinu byly pozorovány jak u myších (Hu *et al.*, 2018), tak u prasečích oocytů (Jiang *et al.*, 2020). Syntetický estrogen DES, dříve předepisovaný v klinické léčbě jako prevence potratů a při nedostatku estrogenu, také svým účinkem způsobuje poruchy formace DV a sestavení chromozomů (Ding *et al.*, 2020). Kvůli mnoha dalším negativním vlivům na organismus člověka bylo zakázáno jeho využívání v humánní medicíně, nicméně jedním z jeho dalších účinků je zvyšování rychlosti růstu zvířat a obsahu bílkovin v tělech zvířat, takže se v některých částech světa stále používá



jako stimulátor růstu v suchozemských chovech (X. Zhang *et al.*, 2011), což pravděpodobně přispívá k jeho stálému výskytu v životním prostředí (Silva *et al.*, 2021).

Přesný způsob, jakým lysmeral ovlivňuje stavbu DV je neznámý, nicméně se pravděpodobně nejedná pouze o jeden konkrétní mechanismus, ale o víceúrovňovou souhru několika procesů. Jednou z možných cest vedoucích k poškození DV je selhání kontrolního bodu napojení meiotického vřeténka (SAC - Spindle assembly checkpoint). Spojení SAC a reprodukčně toxických látek bylo prokázáno ve studii popisující prodlužování mitotické progrese nemístnou aktivací SAC a narušováním napojení MT ke kinetochorám v dělicích se somatických buňkách vlivem BPA (Kim *et al.*, 2019). V tomto experimentu bylo také zjištěno, že BPA ovlivnil správnou lokalizaci proteinů asociovaných s mikrotubuly (MAP) - HURP na proximálních koncích mikrotubulů vřeténka, Kif2a na minusových koncích MT vřeténka a TPX2 lokalizovaným na mitotickém vřeténku. Předpokládá se, že tato chybná lokalizace MAP vede k poruše uchycení vřeténka a tedy i k různým abnormalitám.

Vzhledem k meiotickému bloku doprovázenému prodlouženou profází jsou oocyty vysoce náchylné na poškození DNA. To může být způsobeno různými faktory, včetně působení exogenních reprodukčně toxických látek. Z toho důvodu jsme se zaměřili i na studium vlivu lysmeralu na integritu DNA, zejména pak na vznik dvouvláknových zlomů. Výskyt DSB byl sledován metodou TUNEL postavenou na fluorescenčním značení ložisek poškozené DNA. Analýza potvrdila signifikantní nárůst oocytů s poškozením DNA v experimentálních skupinách koncentrací lysmeralu 500nM a 50  $\mu$ M. Podobný výsledek, jen s řádově vyššími koncentracemi toxické substance, byl popsán na myších oocytech v další studii našeho týmu, kdy byly oocyty akutně vystaveny nízkým dávkám BPS (Prokešová *et al.*, 2020). DBS mohou vznikat buď v důsledku normálních buněčných procesů, nebo po vystavení buněk vlivům prostředí, které poškozují DNA. Předpokládaný mechanismus vzniku DBS je způsoben výskytem reaktivních oxidových radikálů (ROS – reactive oxygen species), které vznikají jako následek oxidačního stresu. Ten byl v mnoha případech detekován ve větší míře u oocytů, které byly akutně vystaveny různým reprodukčně toxickým látkám. Jednou z nich je například insekticid deltametrin, u kterého byl prokázán negativní vliv na myší oocyty (Jia *et al.*, 2019). U těch se kromě nárůstu oxidačního stresu vyskytovaly ve větší míře abnormality DV podobně jako v případě lysmeralu. Stejně poškození vykazovaly myší oocyty ošetřené

fluoren-9-bisfenolem, který je využíván jako jedna z alternativ BPA (Jia *et al.*, 2019). DBS byly v této studii detekované metodou imunofluorescenčního barvení  $\gamma$ -H2AX, který bývá v místech zlomů akumulován.

Pokud jsou organismy akutně nebo chronicky vystaveny expozici směsím EDs či jiných toxických látek, může dojít k bioakumulaci a biochemické komunikaci jednotlivých složek těchto směsí, což může vést k vysoce nepříznivým modifikacím, které následně mohou ještě ve větší míře měnit metabolismus hormonů, snižovat plodnost a způsobovat další závažné abnormality (Dietrich *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2017). V životním prostředí se nevyskytují kontaminanty odděleně, ale jsou přítomny najednou ve formě různých směsí. Problémem je, že různé kombinace a koncentrace toxických látek mohou mít zcela odlišný účinek než jednotlivé sloučeniny samostatně. Vzhledem ke globálnímu rozšíření lysmeralu v životním prostředí, jsou jeho kombinované efekty s jinými polutanty vysoce pravděpodobné. Jedna z nejznámějších studií dokumentujících velmi silný kombinační efekt popisuje účinky farmaceutického estrogenu a perzistentního organochlorového pesticidu (trans-nonachlor). Každý z nich samostatně vykazuje nízkou účinnost, nicméně při současném výskytu se kooperativně vážou na receptor pregnanu X, což vede k jeho synergické aktivaci (Delfosse *et al.*, 2015). V souvislosti s lysmeralem by bylo vhodným předmětem výzkumu sledovat jeho vztah s potenciálně nebezpečnými látkami, se kterými bývá obsažen v kosmetických produktech. V průmyslových produktech se lysmeral hojně vyskytuje například s triklosanem, což je běžná antimikrobiální látka, která však vykazuje endokrinně disruptivní efekt (Veldhoen *et al.*, 2006; Raut & Angus, 2010) a může působit jako agonista hormonů štítné žlázy u člověka (Wolff *et al.*, 2015). Vzhledem k zahlcenosti prostředí různými toxickými látkami se díky těmto experimentům zvedlo povědomí o následcích, ve které tato situace může dospět a také díky tomu v posledních letech dramaticky přibývá studií zdůrazňujících účinky kombinovaných chemických směsí na endokrinní systémy.

Posledním experimentem této práce bylo sledování vlivu lysmeralu na epigenetický marker histon H3K4 a jeho methyloci – H3K4me3 – kde koncovka označuje trimethyloci na 4. lyzinovém zbytku histonu H3. H3K4me3 je konkrétní epigenetická modifikace, která bývá často spojována s regulací genové exprese prostřednictvím remodelace chromatinu komplexem NURF (Nucleosome remodeling factor) (Wysocka

*et al.*, 2006). H3K4me3 pozitivně reguluje transkripci prostřednictvím změny lokalizace histonových acetyláz a NURF. Funkce H3K4me3 je také spojována s ranými embryonálními stádii, kde může být jedním z přímých či vedlejších cílů působení reprodukčně toxických látek (Casati *et al.*, 2013; Otsuka *et al.*, 2014; Faulk *et al.*, 2016). V našem experimentu jsme však nezaznamenali statisticky významný rozdíl v relativní intenzitě fluorescenčního signálu. Vliv lysmeralu na epigenetické markery meiotického zrání prasečích oocytů by mohl být prokázán v případě sledování jiného epigenetického markeru, například represivního histonu H3K27me2, nebo použitím jiného expozičního okna v souvislosti s kultivací oocytů.

Zajímavý efekt související se změnou epigenetických markerů zprostředkovanou EDs byl pozorován ve studii výzkumného týmu Jefferson *et al.* (2013). Předmětem experimentu bylo sledování modifikací několika vývojově specifických histonů (jedním z nich byl právě H3K4me3) u novorozených myší, které byly vystaveny účinkům syntetického estrogenu (DES). Bylo zjištěno, že neonatální expozice DES dočasně mění expresi mnoha chromatin modifikujících proteinů a trvale mění epigenetické značky v děložní tkáni, konkrétně v genovém lokusu *Six1*, což naznačuje mechanismus vývojové expozice vedoucí ke změně reprodukční funkce a zvýšenému riziku rakoviny. Pozměněné epigenetické značky byly detekované také po expozici bisfenolům. Studie Faulk *et al.* (2015) popisuje souvislost mezi expozicí matky BPA a změnami methylačními vzorci v játrech plodu. Hladiny BPA v lidské fetální jaterní tkáni byly spojeny s komplexními lineárními, nemonotónními i sekvenčně závislými změnami v methylaci DNA. V myších oocytech po chronické expozici BPS byly pozorovány změny epigenetického represivního markeru H3K27me2, kdy docházelo ke zvýšení methylace (Nevoral *et al.*, 2018). S ovlivňováním epigenetických markerů způsobeným toxickými látkami může souviset i námi popsaná narušená progresse meiotického zrání.

Změny epigenetických modifikací mohou mít dalekosáhlejší účinky než „jen“ trvalé pozměnění genové exprese u konkrétních jedinců, kteří byli exponováni. Epigenetické značky se totiž mohou přenášet i do následujících generací, což je podstata transgeneračního vlivu, který již byl prokázán u několika toxických látek a EDs. Mezi známé ED, které ovlivňují mužskou a ženskou reprodukci, patří ftaláty, BPA, pesticidy a kontaminanty životního prostředí (Manikkam *et al.*, 2013, 2014; Berger *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017; Nilsson *et al.*, 2018). Změny v epigenetickém kódu se přenáší přes

zárodečnou linii na neexponovanou generaci, u které pak dochází k transgeneračním jevům (Skinner, 2008, 2014; Xin *et al.*, 2015). Aktuální studie vědecké skupiny Nguyen *et al.* (2022) předkládá důkazy o tom, že potomci těhotných myší, které byly vystaveny působení BPA, měly dokonce vážnější následky, než jejich matky pod přímou expozicí.

Dosud nebyly publikovány studie, které by vliv lysmeralu na reprodukci živočichů popisovaly. Naše studie prokázala vliv lysmeralu na klíčový úsek oogeneze, meiotické zrání. Jedná se o důležitá zjištění, která přispívají k teorii, podle které lysmeral spadá do skupiny reprodukčně toxických látek. K plnému objasnění principu působení lysmeralu na oocyty je třeba identifikovat a přesněji popsat molekulární cíle působení lysmeralu v oblasti reprodukčních soustav savců a to i v zájmu ochrany lidského reprodukčního zdraví.

## 7. Závěr

V této diplomové práci byla hodnocena hypotéza negativního vlivu syntetické substance lysmeralu na zrání prasečích oocytů *in vitro*.

- Na základě výsledků imunocytochemie (barvení chromatinu) jsme potvrdili negativní vliv lysmeralu na zrání prasečích oocytů *in vitro*. Oocyty kultivované 48 hodin s nízkými dávkami lysmeralu (5 nM, 500 nM a 50  $\mu$ M) vykazovaly sníženou schopnost dosáhnout stádia druhé meiotické metafáze. Signifikantní rozdíly byly pozorovány ve všech třech experimentálních koncentracích.
- Vlivem expozice lysmeralu došlo u zrajících oocytů také k narušení tvorby DV. Nejčastěji byly pozorovány chyby při napojování ke kinetochorům chromozomů či tvarové abnormality. Statisticky významný rozdíl byl pozorován po kultivaci v 500 nM koncentraci lysmeralu.
- Data ze třetího experimentu potvrdila efekt lysmeralu ve všech testovaných koncentracích na integritu chromatinu zrajícího oocyty. Metodou TUNEL byl detekován a následně statisticky vyhodnocen signifikantně zvýšený výskyt zlomů DNA u oocytů ošetřených lysmeralem v koncentracích 500 nM a 5  $\mu$ M.
- Experimenty neprokázaly vliv lysmeralu na metylaci epigenetického markeru histonu H3K4me3.

## 8. Seznam použité literatury

1. Allen, E., Doisy, E. A. (1983). Landmark article Sept 8, 1923. An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. *JAMA*, 250(19), 2681–2683.
2. Alvarez Sedó, C., Schatten, H., Combelles, C. M., & Rawe, V. Y. (2011). The nuclear mitotic apparatus (NuMA) protein: Localization and dynamics in human oocytes, fertilization and early embryos. *Molecular Human Reproduction*, 17(6), 392–398.
3. Amsterdam, A., Koch, Y., Lieberman, M. E., & Lindner, H. R. (1975). Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *Journal of Cell Biology*, 67(3), 894–900.
4. Amsterdam, A., & Rotmensch, S. (1987). Structure-Function Relationships during Granulosa Cell Differentiation\*. *Endocrine Reviews*, 8(3), 309–337.
5. Anderson, E., Wilkinson, R. F., Lee, G., & Meller, S. (1978). A correlative microscopical analysis of differentiating ovarian follicles of mammals. *Journal of Morphology*, 156(3), 339–366.
6. Anger, M., Kues, W. A., Klima, J., Mielenz, M., Kubelka, M., Motlik, J., Esner, M., Dvorak, P., Carnwath, J. W., & Niemann, H. (2003). Cell cycle dependent expression of Plk1 in synchronized porcine fetal fibroblasts. *Molecular Reproduction and Development*, 65(3), 245–253.
7. Areekijserree, M., Pongsawat, W., Pumipaiboon, M., Thepsithar, C., Sengsai, S., & Chuen-Im, T. (2015). Morphological Interaction of Porcine Oocyte and Cumulus Cells Study on in vitro Oocyte Maturation Using Electron Microscopy. *International Journal of Bioengineering and Life Sciences*, 9(4), 395–398.
8. Asami, M., Lam, B. Y. H., Ma, M. K., Rainbow, K., Braun, S., VerMilyea, M. D., Yeo, G. S. H., & Perry, A. C. F. (2022). Human embryonic genome activation initiates at the one-cell stage. *Cell Stem Cell*, 29(2), 209–216.
9. Ashourzadeh, S., Khalili, M. A., Omid, M., Nottola, S. A., & Faramarzi, A. (2021). Supplementation of IVM culture media with GDF-9 can potentially enhance oocyte quality, fertilization and embryo development in ICSI procedure. *Central Asian Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences Innovation*, 1(2), 44–54.
10. Baker, T. G., & Zuckerman, S. (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 158(972), 417–433.
11. Baran, V., Brzakova, A., Rehak, P., Kovarikova, V., & Solc, P. (2016). PLK1 regulates spindle formation kinetics and APC/C activation in mouse zygote. *Zygote (Cambridge, England)*, 24(3), 338–345.
12. Baran, V., Solc, P., Kovarikova, V., Rehak, P., & Sutovsky, P. (2013). Polo-like kinase 1 is essential for the first mitotic division in the mouse embryo. *Molecular Reproduction and Development*, 80(7), 522–534.
13. Barritt, J. A., Kokot, M., Cohen, J., Steuerwald, N., & Brenner, C. A. (2002). Quantification of human ooplasmic mitochondria. *Reproductive BioMedicine Online*, 4(3), 243–247.
14. Berger, A., Ziv-Gal, A., Cudiamat, J., Wang, W., Zhou, C., & Flaws, J. A. (2016). The effects of in utero bisphenol A exposure on the ovaries in multiple generations of mice. *Reproductive Toxicology*, 60, 39–52.
15. Bernauer, U., Bodin, L., Celleno, L., Chaudhry, Q., Coenraads, P. J., Dusinska, M., Ezendam, J., Gaffet, E., Galli, C. L., Granum, B., Panteri, E., Rogiers, V., Rousselle, Ch., (Rapporteur), M. S., Vanhaecke, T., & Wijnhoven, S. (2017). *SCCS preliminary OPINION ON the safety of Butylphenyl methylpropional (p-BMHCA) in cosmetic products”- Submission II, ref CCS/1591/17—Preliminary version*
16. Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S. L., & Lander, E. S. (2006). A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell*, 125(2), 315–326.
17. Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O. J., & Macleod, D. (1985). A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell*, 40(1), 91–99.
18. Black, J. L., & Erickson, B. H. (1968). Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Record*, 161(1), 45–55.

19. 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.
20. Blenis, J. (1993). Signal transduction via the MAP kinases: Proceed at your own RSK. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(13), 5889–5892.
21. Blij, S., Frum, T., Akyol, A., Fearon, E., & Ralston, A. (2012). Maternal Cdx2 is dispensable for mouse development. *Development*, 139(21), 3969–3972.
22. Bohrer, R. C., Coutinho, A. R. S., Duggavathi, R., & Bordignon, V. (2015). The Incidence of DNA Double-Strand Breaks Is Higher in Late-Cleaving and Less Developmentally Competent Porcine Embryos1. *Biology of Reproduction*, 93(3), 59, 1–8.
23. 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.
24. Brawerman, G. (1981). The Role of the Poly(A) Sequence in Mammalian Messenger RN. *Critical Reviews in Biochemistry*, 10(1), 1–38.
25. Braw-Tal, R., & Yossefi, S. (1997). Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Reproduction*, 109(1), 165–171.
26. Brucker, -Davis F., Thayer, K., & Colborn, T. (2001). Significant effects of mild endogenous hormonal changes in humans: Considerations for low-dose testing. *Environmental Health Perspectives*, 109(suppl 1), 21–26.
27. Bukovsky, A., Caudle, M. R., Svetlikova, M., & Upadhyaya, N. B. (2004). Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 20-30
28. Bultman, S. J., Gebuhr, T. C., Pan, H., Svoboda, P., Schultz, R. M., & Magnuson, T. (2006). Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. *Genes & Development*, 20(13), 1744–1754.
29. Cabry, R., Merviel, P., Madkour, A., Lefranc, E., Scheffler, F., Desailoud, R., Bach, V., & Benkhalifa, M. (2020). The impact of endocrine disruptor chemicals on oocyte/embryo and clinical outcomes in IVF. *Endocrine Connections*, 9(6), 134–142.
30. Calabrese, E. J. (2005). Toxicological awakenings: The rebirth of hormesis as a central pillar of toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204(1), 1–8.
31. Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2001). The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 62(2), 330–338.
32. Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L.-Y., Reidy, J. A., & Needham, L. L. (2008). Urinary Concentrations of Triclosan in the U.S. Population: 2003–2004. *Environmental Health Perspectives*, 116(3), 303–307.
33. Calarco, P. G. (2000). Centrosome precursors in the acentriolar mouse oocyte. *Microscopy Research and Technique*, 49(5), 428–434.
34. Campen, K. A., Kucharczyk, K. M., Bogin, B., Ehrlich, J. M., & Combelles, C. M. H. (2018). Spindle abnormalities and chromosome misalignment in bovine oocytes after exposure to low doses of bisphenol A or bisphenol S. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 33(5), 895–904.
35. 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.
36. Casarini, L., Paradiso, E., Lazzaretti, C., D'Alessandro, S., Roy, N., Mascolo, E., Zaręba, K., García-Gasca, A., & Simoni, M. (2022). Regulation of antral follicular growth by an interplay between gonadotropins and their receptors. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*.
37. Casati, L., Sendra, R., Poletti, A., Negri-Cesi, P., & Celotti, F. (2013). Androgen receptor activation by polychlorinated biphenyls. *Epigenetics*, 8(10), 1061–1068.
38. Charles, A. K., & Darbre, P. D. (2009). Oestrogenic activity of benzyl salicylate, benzyl benzoate and butylphenylmethylpropional (Lilial) in MCF7 human breast cancer cells in vitro. *Journal of Applied Toxicology*,

- 29(5), 422–434.
39. Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S.-M., Schurter, B. T., Aswad, D. W., & Stallcup, M. R. (1999). Regulation of Transcription by a Protein Methyltransferase. *Science*.
  40. Chen, R. H., & Blenis, J. (1990). Identification of Xenopus S6 protein kinase homologs (pp90rsk) in somatic cells: Phosphorylation and activation during initiation of cell proliferation. *Molecular and Cellular Biology*.
  41. Chen, R. Z., Pettersson, U., Beard, C., Jackson-Grusby, L., & Jaenisch, R. (1998). DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*, 395(6697), 89–93.
  42. Chen, Y., Pan, C., Lu, Y., Miao, Y., & Xiong, B. (2021). HDAC8 drives spindle organization during meiotic maturation of porcine oocytes. *Cell Proliferation*, 54(10), 131-139
  43. Chian, R.-C., Ao, A., Clarke, H. J., Tulandi, T., & Tan, S.-L. (1999). Production of steroids from human cumulus cells treated with different concentrations of gonadotropins during culture in vitro. *Fertility and Sterility*, 71(1), 61–66.
  44. Christmann, L., Jung, T., & Moor, R. M. (1994). MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 38(1), 85–90.
  45. Chuva de Sousa Lopes, S. M., van den Driesche, S., Carvalho, R. L. C., Larsson, J., Eggen, B., Surani, M. A., & Mummery, C. L. (2005). Altered primordial germ cell migration in the absence of transforming growth factor beta signaling via ALK5. *Developmental Biology*, 284(1), 194–203.
  46. Colborn, T., & Clement, C. (1992). Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection. *Advances in Modern Environmental Toxicology (USA)*. 1-15.
  47. Colborn, T., vom, S. F. S., & Soto, A. M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*, 101(5), 378–384.
  48. Cooper, D. N., & Krawczak, M. (1989). Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Human Genetics*, 83(2), 181–188.
  49. Corner, G. W. (1917). Maturation of the ovum in swine. *The Anatomical Record*, 13(2), 109–112.
  50. Coskun, S., Uzumcu, M., Lin, Y. C., Friedman, C. I., & Alak, B. M. (1995). Regulation of Cumulus Cell Steroidogenesis by the Porcine Oocyte and Preliminary Characterization of Oocyte-Produced Factor(s). *Biology of Reproduction*, 53(3), 670–675.
  51. Cougot, N., Babajko, S., & Séraphin, B. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *Journal of Cell Biology*, 165(1), 31–40.
  52. Courvalin, J. C., Segil, N., Blobel, G., & Worman, H. J. (1992). The lamin B receptor of the inner nuclear membrane undergoes mitosis-specific phosphorylation and is a substrate for p34cdc2-type protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(27), 19035–19038.
  53. Crews, C. M., & Erikson, R. L. (1992). Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: Relationship to the fission yeast byr1 gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(17), 8205–8209.
  54. Crews, D., Putz, O., Thomas, P., Hayes, T., & Howdeshell, K. (2003). Wildlife as models for the study of how mixtures, low doses, and the embryonic environment modulate the action of endocrine-disrupting chemicals. *Pure and Applied Chemistry*, 75(11–12), 2305–2320.
  55. Crozet, N. (1981). Nucleolar fine structure and RNA synthesis in porcine oocytes during the early stages of antrum formation. *Biol. Cell*, 41, 35–42.
  56. Cummins, J. M. (2004). The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 115, 23–29.
  57. Darbre, P., Yates, J., Curtis, S., & King, R. J. (1983). Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture. *Cancer Research*, 43(1), 349–354.
  58. De Felici, M., Klinger, F. G., Farini, D., Scaldaferrri, M. L., Iona, S., & Lobascio, M. (2005). Establishment of oocyte population in the fetal ovary: Primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death.



- Reproductive BioMedicine Online*, 10(2), 182–191.
59. De La Fuente, R., Baumann, C., & Viveiros, M. M. (2016). Epigenetic Modifications during Mammalian Oogenesis: Emerging Roles of Chromatin Structure during Oocyte Growth and Meiotic Maturation. In *Epigenetics in Human Reproduction and Development*. Epigenetics in Human Reproduction and Development, 13(1), 35–58.
  60. De Sousa, P. A., Caveney, A., Westhusin, M. E., & Watson, A. J. (1998). Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. *Theriogenology*, 49(1), 115–128.
  61. Dean, W., Santos, F., Stojkovic, M., Zakhartchenko, V., Walter, J., Wolf, E., & Reik, W. (2001). Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13734–13738.
  62. Dekel, N., & Beers, W. H. (1980). Development of the rat oocyte in vitro: Inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus. *Developmental Biology*, 75(2), 247–254.
  63. Dekel, N., Lawrence, T. S., Gilula, N. B., & Beers, W. H. (1981). Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Developmental Biology*, 86(2), 356–362.
  64. Delfosse, V., Dendele, B., Huet, T., Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Gerbal-Chaloin, S., Beucher, B., Roecklin, D., Muller, C., Rahmani, R., Cavallès, V., Daujat-Chavanieu, M., Vivat, V., Pascussi, J.-M., Balaguer, P., & Bourguet, W. (2015). Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. *Nature Communications*, 6(1), 8089–8097.
  65. Dewailly, D., Robin, G., Peigne, M., Decanter, C., Pigny, P., & Catteau-Jonard, S. (2016). Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. *Human Reproduction Update*, 22(6), 709–724.
  66. Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., & Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293–342.
  67. Dietrich, S., Ploessl, F., Bracher, F., & Laforsch, C. (2010). Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – A multigenerational study. *Chemosphere*, 79(1), 60–66.
  68. Ding, Z.-M., Hua, L.-P., Ahmad, M. J., Safdar, M., Chen, F., Wang, Y.-S., Zhang, S.-X., Miao, Y.-L., Xiong, J.-J., & Huo, L.-J. (2020). Diethylstilbestrol exposure disrupts mouse oocyte meiotic maturation in vitro through affecting spindle assembly and chromosome alignment. *Chemosphere*, 249, 126–132.
  69. Ding, Z.-M., Jiao, X.-F., Wu, D., Zhang, J.-Y., Chen, F., Wang, Y.-S., Huang, C.-J., Zhang, S.-X., Li, X., & Huo, L.-J. (2017). Bisphenol AF negatively affects oocyte maturation of mouse in vitro through increasing oxidative stress and DNA damage. *Chemico-Biological Interactions*, 278, 222–229.
  70. Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N., & Matzuk, M. M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383(6600), 531–535.
  71. Donovan, M., Tiwary, C. M., Axelrod, D., Sasco, A. J., Jones, L., Hajek, R., Sauber, E., Kuo, J., & Davis, D. L. (2007). Personal care products that contain estrogens or xenoestrogens may increase breast cancer risk. *Medical Hypotheses*, 68(4), 756–766.
  72. ECHA. (2019). *Substance information on 2-(4-tert-butylbenzyl)propionaldehyde*. <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.001.173>
  73. El-Hayek, S., Yang, Q., Abbassi, L., FitzHarris, G., & Clarke, H. J. (2018). Mammalian Oocytes Locally Remodel Follicular Architecture to Provide the Foundation for Germline-Soma Communication. *Current Biology*, 28(7), 1124–1131.
  74. Erickson, B. H. (1966). Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary. *Journal of Animal Science*, 25(3), 800–805.

75. Eskenazi, B., Mocarelli, P., Warner, M., Needham, L., Patterson, D. G., Samuels, S., Turner, W., Gerthoux, P. M., & Brambilla, P. (2004). Relationship of serum TCDD concentrations and age at exposure of female residents of Seveso, Italy. *Environmental Health Perspectives*, *112*(1), 22–27.
76. European Commission. (2009). *Regulation (EC) No 1223/2009 of the European parliament and of the council of 30 november 2009 on cosmetic products*. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj>
77. Farr, S. L., Cooper, G. S., Cai, J., Savitz, D. A., & Sandler, D. P. (2004). Pesticide Use and Menstrual Cycle Characteristics among Premenopausal Women in the Agricultural Health Study. *American Journal of Epidemiology*, *160*(12), 1194–1204.
78. Faulk, C., Kim, J. H., Anderson, O. S., Nahar, M. S., Jones, T. R., Sartor, M. A., & Dolinoy, D. C. (2016). Detection of differential DNA methylation in repetitive DNA of mice and humans perinatally exposed to bisphenol A. *Epigenetics*, *11*(7), 489–500.
79. 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), 230–246
80. Fortune, J. E., & Eppig, J. J. (1979). Effects of Gonadotropins on Steroid Secretion by Infantile and Juvenile Mouse Ovaries in Vitro\*. *Endocrinology*, *105*(3), 760–768.
81. Frum, T., Halbisen, M. A., Wang, C., Amiri, H., Robson, P., & Ralston, A. (2013). Oct4 Cell-Autonomously Promotes Primitive Endoderm Development in the Mouse Blastocyst. *Developmental Cell*, *25*(6), 610–622.
82. Fushii, M., Yamada, R., Lee, J., & Miyano, T. (2021). Reestablishment of transzonal projections and growth of bovine oocytes in vitro. *The Journal of Reproduction and Development*, *67*(5), 300–306.
83. Gebauer, F., & Richter, J. D. (1997). Synthesis and function of Mos: The control switch of vertebrate oocyte meiosis. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *19*(1), 23–28.
84. Genuis, S. J., Beesoon, S., Birkholz, D., & Lobo, R. A. (2011). Human Excretion of Bisphenol A: Blood, Urine, and Sweat (BUS) Study. *Journal of Environmental and Public Health*, *2012*, 85–113.
85. Gerace, L., & Blobel, G. (1980). The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell*, *19*(1), 277–287.
86. Gibson, D. A., & Saunders, P. T. K. (2014). Endocrine disruption of oestrogen action and female reproductive tract cancers. *Endocrine-Related Cancer*, *21*(2), 113–131.
87. Gilchrist, R. B., Ritter, L. J., & Armstrong, D. T. (2001). Mouse Oocyte Mitogenic Activity Is Developmentally Coordinated throughout Folliculogenesis and Meiotic Maturation. *Developmental Biology*, *240*(1), 289–298.
88. Ginsburg, M., Snow, M. H., & McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, *110*(2), 521–528.
89. Gong, Y., Li-Ling, J., Xiong, D., Wei, J., Zhong, T., & Tan, H. (2021). Age-related decline in the expression of GDF9 and BMP15 genes in follicle fluid and granulosa cells derived from poor ovarian responders. *Journal of Ovarian Research*, *14*(1), 346–350.
90. González, N., Cunha, S. C., Monteiro, C., Fernandes, J. O., Marquès, M., Domingo, J. L., & Nadal, M. (2019). Quantification of eight bisphenol analogues in blood and urine samples of workers in a hazardous waste incinerator. *Environmental Research*, *176*, 576–589.
91. 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.
92. Gotoh, Y., Masuyama, N., Dell, K., Shirakabe, K., & Nishida, E. (1995). Initiation of Xenopus Oocyte Maturation by Activation of the Mitogen-activated Protein Kinase Cascade (\*). *Journal of Biological Chemistry*, *270*(43), 258–259.
93. Goudet, G., Mugnier, S., Callebaut, I., & Monget, P. (2008). Phylogenetic Analysis and Identification of

- Pseudogenes Reveal a Progressive Loss of Zona Pellucida Genes During Evolution of Vertebrates<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 78(5), 796–806.
94. Gross, S. D., Lewellyn, A. L., & Maller, J. L. (2001). A constitutively active form of the protein kinase p90Rsk1 is sufficient to trigger the G2/M transition in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 460–463.
  95. Gross, S. D., Schwab, M. S., Lewellyn, A. L., & Maller, J. L. (1999). Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase p90Rsk. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5443), 1365–1367.
  96. Gross, S. D., Schwab, M. S., Taieb, F. E., Lewellyn, A. L., Qian, Y.-W., & Maller, J. L. (2000). The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90Rsk. *Current Biology*, 10(8), 430–438.
  97. Groth, C. G. (2007). Prospects of using organs and cells from pigs for transplantation into humans. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 32(1), 20–25. PubMed. <http://europepmc.org/abstract/MED/17344582>
  98. Guigon, C. J., & Magre, S. (2006). Contribution of Germ Cells to the Differentiation and Maturation of the Ovary: Insights from Models of Germ Cell Depletion. *Biology of Reproduction*, 74(3), 450–458.
  99. 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*, 9(13), 680–689.
  100. Hancock, G. V., Wamaitha, S. E., Peretz, L., & Clark, A. T. (2021). Mammalian primordial germ cell specification. *Development*, 148(6), 290–301.
  101. Harvey, P. W., & Darbre, P. (2004). Endocrine disrupters and human health: Could oestrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women? *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 24(3), 167–176.
  102. He, M., Zhang, T., Yang, Y., & Wang, C. (2021). Mechanisms of Oocyte Maturation and Related Epigenetic Regulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 654–668.
  103. Hedrick, J. L., & Wardrip, N. J. (1987). On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. *Developmental Biology*, 121(2), 478–488.
  104. Herbst, A. L., Ulfelder, H., & Poskanzer, D. C. (1971). Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *The New England Journal of Medicine*, 284(15), 878–881.
  105. Hinckley, M., Vaccari, S., Horner, K., Chen, R., & Conti, M. (2005). The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. *Developmental Biology*, 287(2), 249–261.
  106. Hirano, T. (2015). Chromosome Dynamics during Mitosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(6), 157–192.
  107. 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.
  108. 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.
  109. Hosoe, M., & Shioya, Y. (1997). Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. *Zygote*, 5(4), 371–376.
  110. Hu, L.-L., Zhou, X., Zhang, H.-L., Wu, L.-L., Tang, L.-S., Chen, L.-L., & Duan, J.-L. (2018). Exposure to podophyllotoxin inhibits oocyte meiosis by disturbing meiotic spindle formation. *Scientific Reports*, 8(1), 10–45.
  111. Hummitzsch, K., Irving-Rodgers, H. F., Hatzirodos, N., Bonner, W., Sabatier, L., Reinhardt, D. P., Sado, Y., Ninomiya, Y., Wilhelm, D., & Rodgers, R. J. (2013). A New Model of Development of the Mammalian Ovary and Follicles. *PLOS ONE*, 8(2), 555–578.

112. Hunt, P. A., Koehler, K. E., Susiarjo, M., Hodges, C. A., Ilagan, A., Voigt, R. C., Thomas, S., Thomas, B. F., & Hassold, T. J. (2003). Bisphenol A Exposure Causes Meiotic Aneuploidy in the Female Mouse. *Current Biology*, 13(7), 546–553.
113. Hussein, T. S., Thompson, J. G., & Gilchrist, R. B. (2006). Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Developmental Biology*, 296(2), 514–521.
114. Hutt, K. J., McLaughlin, E. A., & Holland, M. K. (2006). Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Molecular Human Reproduction*, 12(2), 61–69.
115. Hyttel, P., Fair, T., Avery, B., Callesen, H., & Greve, T. (1999). Transcriptional Activity and Ultrastructure in Bovine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 34(5), 447–454.
116. 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.
117. International Programme on Chemical Safety. (2002). *Global assessment on the state of the science of endocrine disruptors. WHO/PCS/EDC/02.2*. WHO IRIS. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67357>
118. Iwata, H., Goto, H., Tanaka, H., Sakaguchi, Y., Kimura, K., Kuwayama, T., Monji, Y., Iwata, H., Goto, H., Tanaka, H., Sakaguchi, Y., Kimura, K., Kuwayama, T., & Monji, Y. (2011). Effect of maternal age on mitochondrial DNA copy number, ATP content and IVF outcome of bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(3), 424–432.
119. Izquierdo-Rico, M. J., Jiménez-Movilla, M., Llop, E., Pérez-Oliva, A. B., Ballesta, J., Gutiérrez-Gallego, R., Jiménez-Cervantes, C., & Avilés, M. (2009). Hamster Zona Pellucida Is Formed by Four Glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4. *Journal of Proteome Research*, 8(2), 926–941.
120. Jaffe, L. A., & Egbert, J. R. (2017). Regulation of Mammalian Oocyte Meiosis by Intercellular Communication Within the Ovarian Follicle. *Annual Review of Physiology*, 79(1), 237–260.
121. Jefferson, W. N., Chevalier, D. M., Phelps, J. Y., Cantor, A. M., Padilla-Banks, E., Newbold, R. R., Archer, T. K., Kinyamu, H. K., & Williams, C. J. (2013). Persistently Altered Epigenetic Marks in the Mouse Uterus After Neonatal Estrogen Exposure. *Molecular Endocrinology*, 27(10), 1666–1677.
122. Jia, Z., Wang, H., Feng, Z., Zhang, S., Wang, L., Zhang, J., Liu, Q., Zhao, X., Feng, D., & Feng, X. (2019). Fluorene-9-bisphenol exposure induces cytotoxicity in mouse oocytes and causes ovarian damage. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180, 168–178.
123. Jia, Z.-Z., Zhang, J.-W., Zhou, D., Xu, D.-Q., & Feng, X.-Z. (2019). Deltamethrin exposure induces oxidative stress and affects meiotic maturation in mouse oocyte. *Chemosphere*, 223, 704–713.
124. Jiang, W.-J., Hu, L.-L., Ren, Y.-P., Lu, X., Luo, X.-Q., Li, Y.-H., & Xu, Y.-N. (2020). Podophyllotoxin affects porcine oocyte maturation by inducing oxidative stress-mediated early apoptosis. *Toxicol*, 176, 15–20.
125. Jin, S.-L. C., & Conti, M. (2002). Induction of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4B is essential for LPS-activated TNF- $\alpha$  responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7628–7633.
126. 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.
127. Kabir, E. R., Rahman, M. S., & Rahman, I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(1), 241–258.
128. Kageyama, S., Liu, H., Kaneko, N., Ooga, M., Nagata, M., & Aoki, F. (2007). Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction (Cambridge, England)*, 133(1), 85–94.
129. Kanitz, W., Brussow, K., Becker, F., Torner, H., Schneider, F., Kubelka, M., & Tomek, W. (2001). Comparative aspects of follicular development, follicular and oocyte maturation and ovulation in cattle and pigs. *Archiv Fur Tierzucht*, 44, 9–23.
130. Karasu, M. E., Bouftas, N., Keeney, S., & Wassmann, K. (2019). Cyclin B3 promotes anaphase I onset in oocyte meiosis. *Journal of Cell Biology*, 218(4), 1265–1281. <https://doi.org/10.1083/jcb.201808091>
131. Kaufman, M. L., & Homa, S. T. (1993). Defining a role for calcium in the resumption and progression of

- meiosis in the pig oocyte. *Journal of Experimental Zoology*, 265(1), 69–76.
132. Kerr, J. B., Hutt, K. J., Michalak, E. M., Cook, M., Vandenberg, C. J., Liew, S. H., Bouillet, P., Mills, A., Scott, C. L., Findlay, J. K., & Strasser, A. (2012). DNA Damage-Induced Primordial Follicle Oocyte Apoptosis and Loss of Fertility Require TAp63-Mediated Induction of Puma and Noxa. *Molecular Cell*, 48(3), 343–352.
133. Kikuchi, K., Naito, K., Noguchi, J., Shimada, A., Kaneko, H., Yamashita, M., Aoki, F., Tojo, H., & Toyoda, Y. (2000). Maturation/M-Phase Promoting Factor: A Regulator of Aging in Porcine Oocytes1. *Biology of Reproduction*, 63(3), 715–722.
134. Kim, N. H., Funahashi, H., Prather, R. S., Schatten, G., & Day, B. N. (1996). Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 43(2), 248–255.
135. Kim, Y.-H., Lee, I.-W., Jo, Y.-J., Kim, N.-H., & Namgoong, S. (2019). Acentriolar microtubule organization centers and Ran-mediated microtubule formation pathways are both required in porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 86(8), 972–983. <https://doi.org/10.1002/mrd.23172>
136. Kishimoto, T. (2003). Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6), 654–663.
137. Knez, J., Kranvogel, R., Breznik, B. P., Vončina, E., & Vlaisavljević, V. (2014). Are urinary bisphenol A levels in men related to semen quality and embryo development after medically assisted reproduction? *Fertility and Sterility*, 101(1), 215-221.e5.
138. Kotani, T., Yasuda, K., Ota, R., & Yamashita, M. (2013). Cyclin B1 mRNA translation is temporally controlled through formation and disassembly of RNA granules. *Journal of Cell Biology*, 202(7), 1041–1055.
139. Krisher, R. L., & Bavister, B. D. (1998). Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*, 49(1), 103–114.
140. Kruip, T. a. M., Cran, D. G., van Beneden, T. H., & Dieleman, S. J. (1983). Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gamete Research*, 8(1), 29–47.
141. Lawrence, T. S., Dekel, N., & Beers, W. H. (1980). Binding of Human Chorionic Gonadotropin by Rat Cumuli Oophori and Granulosa Cells: A Comparative Study\*. *Endocrinology*, 106(4), 1114–1118.
142. Lee, D.-H., Steffes, M. W., Sjödin, A., Jones, R. S., Needham, L. L., & Jr, D. R. J. (2011). Low Dose Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls Predict Obesity, Dyslipidemia, and Insulin Resistance among People Free of Diabetes. *PLOS ONE*, 6(1), 159–177.
143. Lefièvre, L., Conner, S. J., Salpekar, A., Olufowobi, O., Ashton, P., Pavlovic, B., Lenton, W., Afnan, M., Brewis, I. A., Monk, M., Hughes, D. C., & Barratt, C. L. R. (2004). Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human\*. *Human Reproduction*, 19(7), 1580–1586.
144. Leibfried, L., & First, N. L. (1980). Effect of Bovine and Porcine Follicular Fluid and Granulosa Cells on Maturation of Oocytes in vitro1. *Biology of Reproduction*, 23(4), 699–704.
145. Li, D.-K., Zhou, Z., Miao, M., He, Y., Wang, J., Ferber, J., Herrinton, L. J., Gao, E., & Yuan, W. (2011). Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertility and Sterility*, 95(2), 625-630.
146. Li, E., Beard, C., & Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366(6453), 362–365.
147. Li, J., Li, C., Liu, X., Yang, J., Zhang, Q., Han, W., & Huang, G. (2022). GDF9 concentration in embryo culture medium is linked to human embryo quality and viability. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39(1), 117–125.
148. Li, R., & Albertini, D. F. (2013). The road to maturation: Somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(3), 141–152.
149. Liao, C., & Kannan, K. (2013). Concentrations and Profiles of Bisphenol A and Other Bisphenol Analogues in Foodstuffs from the United States and Their Implications for Human Exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(19), 4655–4662.

150. Link, J., Paouneskou, D., Velkova, M., Daryabeigi, A., Laos, T., Labella, S., Barroso, C., Pacheco Piñol, S., Montoya, A., Kramer, H., Woglar, A., Baudrimont, A., Markert, S. M., Stigloher, C., Martinez-Perez, E., Dammermann, A., Alsheimer, M., Zetka, M., & Jantsch, V. (2018). Transient and Partial Nuclear Lamina Disruption Promotes Chromosome Movement in Early Meiotic Prophase. *Developmental Cell*, *45*(2), 212–225.
151. Liu, X. J. (2012). Polar body emission. *Cytoskeleton*, *69*(10), 670–685.
152. Luca, X., Martínez, E. A., Roca, J., Vázquez, J. M., Gil, M. A., Pastor, L. M., & Alabart, J. L. (2002). Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology*, *58*(5), 871–885.
153. 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.
154. Luo, Y., Na, Z., & Slavoff, S. A. (2018). P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. *Biochemistry*, *57*(17), 2424–2431.
155. 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 (Oxford, England)*, *28*(10), 2735–2745.
156. Magnano, M., Silvani, S., Vincenzi, C., Nino, M., & Tosti, A. (2009). Contact allergens and irritants in household washing and cleaning products. *Contact Dermatitis*, *61*(6), 337–341.
157. Makabe, S., Naguro, T., & Stallone, T. (2006). Oocyte–follicle cell interactions during ovarian follicle development, as seen by high resolution scanning and transmission electron microscopy in humans. *Microscopy Research and Technique*, *69*(6), 436–449.
158. Maller, J. L., Gautier, J., Langan, T. A., Lohka, M. J., Shenoy, S., Shalloway, D., & Nurse, P. (1989). Maturation-promoting factor and the regulation of the cell cycle. *Journal of Cell Science*, *1989*(Supplement\_12), 53–63.
159. Mallory, M. J., Cooper, K. F., & Strich, R. (2007). Meiosis-Specific Destruction of the Ume6p Repressor by the Cdc20-Directed APC/C. *Molecular Cell*, *27*(6), 951–961.
160. Manandhar, G., Schatten, H., & Sutovsky, P. (2005). Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biology of Reproduction*, *72*(1), 2–13.
161. Manikkam, M., Haque, M. M., Guerrero-Bosagna, C., Nilsson, E. E., & Skinner, M. K. (2014). Pesticide Methoxychlor Promotes the Epigenetic Transgenerational Inheritance of Adult-Onset Disease through the Female Germline. *PLOS ONE*, *9*(7), 100–103.
162. Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., & Skinner, M. K. (2013). Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, Reproductive Disease and Sperm Epimutations. *PLOS ONE*, *8*(1), 553–587.
163. Marangos, P., & Carroll, J. (2012). Oocytes Progress beyond Prophase in the Presence of DNA Damage. *Current Biology*, *22*(11), 989–994.
164. 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.
165. Margueron, R., Trojer, P., & Reinberg, D. (2005). The key to development: Interpreting the histone code? *Current Opinion in Genetics & Development*, *15*(2), 163–176.
166. Maro, B., Johnson, M. H., Pickering, S. J., & Flach, G. (1984). Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, *81*, 211–237.
167. Martyniuk, C. J., Mehinto, A. C., & Denslow, N. D. (2020). Organochlorine pesticides: Agrochemicals with potent endocrine-disrupting properties in fish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *507*, 11–14.
168. Masciarelli, S., Horner, K., Liu, C., Park, S. H., Hinckley, M., Hockman, S., Nedachi, T., Jin, C., Conti, M., & Manganiello, V. (2004). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female

- infertility. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(2), 196–205.
169. 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.
170. Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., & Haaf, T. (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 403(6769), 501–502.
171. McLachlan, J. A. (2006). Commentary: Prenatal exposure to diethylstilbestrol (DES): a continuing story. *International Journal of Epidemiology*, 35(4), 868–870.
172. 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.
173. 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.
174. Melnick, R., Lucier, G., Wolfe, M., Hall, R., Stancel, G., Prins, G., Gallo, M., Reuhl, K., Ho, S.-M., Brown, T., Moore, J., Leakey, J., Haseman, J., & Kohn, M. (2002). Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review. *Environmental Health Perspectives*, 110(4), 427–431.
175. Messinger, S. M., & Albertini, D. F. (1991). Centrosome and microtubule dynamics during meiotic progression in the mouse oocyte. *Journal of Cell Science*, 100(2), 289–298.
176. Mintz, B. (1957). Embryological Development of Primordial Germ-cells in the Mouse: Influence of a New Mutation, Wj1. *Development*, 5(4), 396–403.
177. Mitchison, T., & Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312(5991), 237–242.
178. Miyano, T., Ogushi, S., Bui, H.-T., & Lee, J. (2007). Meiotic Resumption and Spindle Formation of Pig Oocytes. *Journal of Mammalian Ova Research*, 24(3), 92–98.
179. Mnif, W., Pillon, A., Balaguer, P., & Bartegi, A. (2007). Les perturbateurs endocriniens xénoestrogéniques: Mécanismes moléculaires et méthodes de détection. *Therapies*, 62(5), 369–386.
180. Mok-Lin, E., Ehrlich, S., Williams, P. L., Petrozza, J., Wright, D. L., Calafat, A. M., Ye, X., & Hauser, R. (2010). Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF. *International Journal of Andrology*, 33(2), 385–393.
181. 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*, 130(18), 4279–4286.
182. Moore, G. P., & Lintern-Moore, S. (1978). Transcription of the mouse oocyte genome. *Biology of Reproduction*, 18(5), 865–870.
183. Morgan, M., Much, C., DiGiacomo, M., Azzi, C., Ivanova, I., Vitsios, D. M., Pistollic, J., Collier, P., Moreira, P. N., Benes, V., Enright, A. J., & O'Carroll, D. (2017). mRNA 3' uridylation and poly(A) tail length sculpt the mammalian maternal transcriptome. *Nature*, 548(7667), 347–351.
184. Morley, P., Whitfield, J. F., Vanderhyden, B. C., Tsang, B. K., & Schwartz, J. L. (1992). A new, nongenomic estrogen action: The rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology*, 131(3), 1305–1312.
185. 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.
186. 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.
187. Motlík, J., & Fulka, J. (1986). Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Twelfth Annual Conference of the International Embryo Transfer Society*, 25(1), 87–96.
188. Motlík, J., Kopečný, V., Trávník, P., & Pivko, J. (1984). RNA synthesis in pig follicular oocytes. Autoradiographic and cytochemical study. *Biology of the Cell*, 50(3), 229–235.
189. Motta, P. M., Makabe, S., Naguro, T., & Correr, S. (1994). Oocyte Follicle Cells Association during Development of Human Ovarian Follicle. A Study by High Resolution Scanning and Transmission Electron

- Microscopy. *Archives of Histology and Cytology*, 57(4), 369–394.
190. Murakoshi, Y., Sueoka, K., Takahashi, K., Sato, S., Sakurai, T., Tajima, H., & Yoshimura, Y. (2013). Embryo developmental capability and pregnancy outcome are related to the mitochondrial DNA copy number and ooplasmic volume. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(10), 1367–1375.
191. Murawski, A., Fiedler, N., Schmied-Tobies, M. I. H., Rucic, E., Schwedler, G., Stoeckelhuber, M., Scherer, G., Pluym, N., Scherer, M., & Kolossa-Gehring, M. (2020). Metabolites of the fragrance 2-(4-tert-butylbenzyl)propionaldehyde (lysmeral) in urine of children and adolescents in Germany – Human biomonitoring results of the German Environmental Survey 2014–2017 (GerES V). *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 229, 513–524.
192. Nakano, M., & Yonezawa, N. (2001). Localization of Sperm Ligand Carbohydrate Chains in Pig Zona pellucida Glycoproteins. *Cells Tissues Organs*, 168(1–2), 65–75.
193. Nawaz, Z., Tsai, M.-J., McDonnell, D. P., & O'Malley, B. W. (1992). Identification of novel steroid-response elements. *Gene Expression*, 2(1), 39–47.
194. Nevoral, J., Kolinko, Y., Moravec, J., Žalmanová, T., Hošková, K., Prokešová, Š., Klein, P., Ghaibour, K., Hošek, P., Štiavnická, M., Řimnáčová, H., Tonar, Z., Petr, J., & Králíčková, M. (2018). Long-term exposure to very low doses of bisphenol S affects female reproduction. *Reproduction*, 156(1), 47–57.
195. Nguyen, H. T., Li, L., Eguchi, A., Agusa, T., Yamamoto, K., Kannan, K., Kim, E.-Y., & Iwata, H. (2022). Effects of gestational exposure to bisphenol A on the hepatic transcriptome and lipidome of rat dams: Intergenerational comparison of effects in the offspring. *Science of The Total Environment*, 826, 153990.
196. Niemann, H., & Wrenzycki, C. (2000). Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: Implications for subsequent development. *Theriogenology*, 53(1), 21–34.
197. Nilsson, E., Klukovich, R., Sadler-Riggelman, I., Beck, D., Xie, Y., Yan, W., & Skinner, M. K. (2018). Environmental toxicant induced epigenetic transgenerational inheritance of ovarian pathology and granulosa cell epigenome and transcriptome alterations: Ancestral origins of polycystic ovarian syndrome and primary ovarian insufficiency. *Epigenetics*, 13(8), 875–895.
198. Nishi, Y., Takeshita, T., Sato, K., & Araki, T. (2003). Change of the Mitochondrial Distribution in Mouse Ooplasm During In Vitro Maturation. *Journal of Nippon Medical School*, 70(5), 408–415.
199. Noguchi, S., Yonezawa, N., Katsumata, T., Hashizume, K., Kuwayama, M., Hamano, S., Watanabe, S., & Nakano, M. (1994). Characterization of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1201(1), 7–14.
200. Norbury, C., & Nurse, P. (1992). Animal Cell Cycles and Their Control. *Annual Review of Biochemistry*, 61(1), 441–468.
201. Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V. O., & Jaffe, L. A. (2009). Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*, 136(11), 1869–1878.
202. Oakley, C. E., & Oakley, B. R. (1989). Identification of  $\gamma$ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 338(6217), 662–664.
203. Ocampo, M. B., Ocampo, L. T., & Kanagawa, H. (1990). Timing of sequential changes in chromosome configurations during the 1st meiotic division of pig oocytes cultured in vitro. *The Japanese Journal of Veterinary Research*, 38(3–4), 127–137.
204. Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S. C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovskiy, A., Saitou, M., & Surani, M. A. (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*, 436(7048), 207–213.
205. Orisaka, M., Tajima, K., Mizutani, T., Miyamoto, K., Tsang, B. K., Fukuda, S., Yoshida, Y., & Kotsuji, F. (2006). Granulosa Cells Promote Differentiation of Cortical Stromal Cells into Theca Cells in the Bovine Ovary1.



- Biology of Reproduction*, 75(5), 734–740.
206. Otsuka, S., Ishihara, A., & Yamauchi, K. (2014). Ioxynil and Tetrabromobisphenol A Suppress Thyroid-Hormone-Induced Activation of Transcriptional Elongation Mediated by Histone Modifications and RNA Polymerase II Phosphorylation. *Toxicological Sciences*, 138(2), 290–299.
207. Ottaviano, Y., & Gerace, L. (1985). Phosphorylation of the nuclear lamins during interphase and mitosis. *Journal of Biological Chemistry*, 260(1), 624–632.
208. Pawlak, P., Cieslak, A., Warzych, E., Zejden, Z., Szumacher-Strabel, M., Molinska-Glura, M., & Lechniak, D. (2012). No single way to explain cytoplasmic maturation of oocytes from prepubertal and cyclic gilts. *Theriogenology*, 78(9), 2020–2030.
209. Pawlak, P., Renska, N., Pers-Kamczyc, E., Warzych, E., & Lechniak, D. (2011). The quality of porcine oocytes is affected by sexual maturity of the donor gilt. *Reproductive Biology*, 11(1), 1–18.
210. Pepling, M. E. (2006). From primordial germ cell to primordial follicle: Mammalian female germ cell development. *Genesis*, 44(12), 622–632.
211. 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.
212. Persani, L., Rossetti, R., Di Pasquale, E., Cacciatore, C., & Fabre, S. (2014). The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Human Reproduction Update*, 20(6), 869–883.
213. Pesatori, A. C., Consonni, D., Bachetti, S., Zocchetti, C., Bonzini, M., Baccarelli, A., & Bertazzi, P. A. (2003). Short- and Long-Term Morbidity and Mortality in the Population Exposed to Dioxin after the “Seveso Accident”. *Industrial Health*, 41(3), 127–138.
214. Peters, H., Harris, G. W., & Edwards, R. G. (1970). Migration of gonocytes into the mammalian gonad and their differentiation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 259(828), 91–101.
215. Petr, J., Rozinek, J., Hruban, V., Jílek, F., Sedmíková, M., Vanourková, Z., & Nemecek, Z. (2001). Ultrastructural localization of calcium deposits during in vitro culture of pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 58(2), 196–204.
216. Petr, J., Urbánková, D., Tománek, M., Rozinek, J., & Jílek, F. (2002). Activation of in vitro matured pig oocytes using activators of inositol triphosphate or ryanodine receptors. *Animal Reproduction Science*, 70(3–4), 235–249.
217. Picton, H., Briggs, D., & Gosden, R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145(1), 27–37.
218. Pines, J., & Hunter, T. (1994). The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *The EMBO Journal*, 13(16), 3772–3781.
219. Plachot, M., & Crozet, N. (1992). Fertilization abnormalities in human in-vitro fertilization. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 7 Suppl 1, 89–94.
220. Pluym, N., Krnac, D., Gilch, G., Scherer, M., Leibold, E., & Scherer, G. (2016). A liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the human biomonitoring of non-occupational exposure to the fragrance 2-(4-tert-butylbenzyl)propionaldehyde (lysmeral). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(21), 5873–5882.
221. Polan, M. L., Laufer, N., Ohkawa, R., Botero-Ruiz, W., Haseltine, F. P., Decherney, A. H., & Behrman, H. R. (1984). The Association between Granulosa Cell Aromatase Activity and Oocyte-Corona-Cumulus-Complex Maturity from Individual Human Follicles\*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 59(1), 170–174.
222. Potter, L. R. (1998). Phosphorylation-Dependent Regulation of the Guanylyl Cyclase-Linked Natriuretic Peptide Receptor B: Dephosphorylation Is a Mechanism of Desensitization. *Biochemistry*, 37(8), 2422–2429.

223. Prokešová, Š., Ghaibour, K., Liška, F., Klein, P., Fenclová, T., Štiavnická, M., Hošek, P., Žalmanová, T., Hošková, K., Řimnáčová, H., Petr, J., Králíčková, M., & Nevoral, J. (2020). Acute low-dose bisphenol S exposure affects mouse oocyte quality. *Reproductive Toxicology*, *93*, 19–27.
224. Rattan, S., & Flaws, J. A. (2019). The epigenetic impacts of endocrine disruptors on female reproduction across generations†. *Biology of Reproduction*, *101*(3), 635–644.
225. Raut, S. A., & Angus, R. A. (2010). Triclosan has endocrine-disrupting effects in male western mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *29*(6), 1287–1291.
226. Reimann, J. D. R., 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.
227. Reimann, J. D. R., & Jackson, P. K. (2002). Emi1 is required for cytostatic factor arrest in vertebrate eggs. *Nature*, *416*(6883), 850–854.
228. Richards, J. S., Ren, Y. A., Candelaria, N., Adams, J. E., & Rajkovic, A. (2017). Ovarian Follicular Theca Cell Recruitment, Differentiation, and Impact on Fertility: 2017 Update. *Endocrine Reviews*, *39*(1), 1–20.
229. Rohwer, F., & Azam, F. (2000). Detection of DNA Damage in Prokaryotes by Terminal Deoxyribonucleotide Transferase-Mediated dUTP Nick End Labeling. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(3), 1001–1006.
230. Rosenfeld, C. S., Wagner, J. S., Roberts, R. M., & Lubahn, D. B. (2001). Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction (Cambridge, England)*, *122*(2), 215–226.
231. Rougier, N., Bourc'his, D., Gomes, D. M., Niveleau, A., Plachot, M., Pàldi, A., & Viegas-Péquignot, E. (1998). Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes & Development*, *12*(14), 2108–2113.
232. Russo, G., Barbato, F., & Grumetto, L. (2017). Monitoring of bisphenol A and bisphenol S in thermal paper receipts from the Italian market and estimated transdermal human intake: A pilot study. *Science of The Total Environment*, *599–600*, 68–75.
233. 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.
234. Saitou, M., Barton, S. C., & Surani, M. A. (2002). A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature*, *418*(6895), 293–300.
235. Santos, T. A., Dias, C., Henriques, P., Brito, R., Barbosa, A., Regateiro, F., & Santos, A. A. (2003). Cytogenetic Analysis of Spontaneously Activated Noninseminated Oocytes and Parthenogenetically Activated Failed Fertilized Human Oocytes—Implications for the Use of Primate Parthenotes for Stem Cell Production. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *20*(3), 122–130.
236. Sathananthan, A. H., Selvaraj, K., Girijashankar, M. L., Ganesh, V., Selvaraj, P., & Trounson, A. O. (2006). From oogonia to mature oocytes: Inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microscopy Research and Technique*, *69*(6), 396–407.
237. Sawyer, H. R., Smith, P., Heath, D. A., Juengel, J. L., Wakefield, St. J., & McNatty, K. P. (2002). Formation of Ovarian Follicles During Fetal Development in Sheep1. *Biology of Reproduction*, *66*(4), 1134–1150.
238. SCCS. (2019). *Opinion on the safety of Butylphenyl methylpropional (p-BMHCA) in cosmetic products—Submission II*. 68–70.
239. Schatten, H., Cheney, R., Balczon, R., Willard, M., Cline, C., Simerly, C., & Schatten, G. (1986). Localization of fodrin during fertilization and early development of sea urchins and mice. *Developmental Biology*, *118*(2), 457–466.
240. Schatten, H., Rawe, V. Y., & Sun, Q.-Y. (2019). Cytoskeletal Architecture of Human Oocytes with a Focus on Centrosomes and their Significant Role in Fertilization. In Z. P. Nagy, A. C. Varghese, & A. Agarwal (Eds.), *In Vitro Fertilization: A Textbook of Current and Emerging Methods and Devices* (pp. 915–928). Springer International Publishing.

241. Schatten, H., & Sun, Q.-Y. (2011). Centrosome dynamics during mammalian oocyte maturation with a focus on meiotic spindle formation. *Molecular Reproduction and Development*, 78(10–11), 757–768.
242. Scherer, M., Koch, H. M., Schütze, A., Pluym, N., Krnac, D., Gilch, G., Leibold, E., & Scherer, G. (2017). Human metabolism and excretion kinetics of the fragrance lysmeral after a single oral dosage. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220(2 Pt A), 123–129.
243. Scherer, M., Petreanu, W., Weber, T., Scherer, G., Pluym, N., & Kolossa-Gehring, M. (2021). Human biomonitoring in urine samples from the Environmental Specimen Bank reveals a decreasing trend over time in the exposure to the fragrance chemical lysmeral from 2000 to 2018. *Chemosphere*, 265, 128–135.
244. Sela-Abramovich, S., Galiani, D., Nevo, N., & Dekel, N. (2008). Inhibition of Rat Oocyte Maturation and Ovulation by Nitric Oxide: Mechanism of Action1. *Biology of Reproduction*, 78(6), 1111–1118.
245. Severson, A. F., von Dassow, G., & Bowerman, B. (2016). Oocyte Meiotic Spindle Assembly and Function. *Current Topics in Developmental Biology*, 116, 65–98.
246. Sharma, S., Ahmad, S., Afjal, M. A., Habib, H., Parvez, S., & Raisuddin, S. (2019). Dichotomy of bisphenol A-induced expression of peroxisome proliferator-activated receptors in hepatic and testicular tissues in mice. *Chemosphere*, 236, 124264. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.234>
247. Shimada, M., & Terada, T. (2002). FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: A requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. *Molecular Human Reproduction*, 8(7), 612–618.
248. Shuhaibar, L. C., Robinson, J. W., Vigone, G., Shuhaibar, N. P., Egbert, J. R., Baena, V., Uliasz, T. F., Kaback, D., Yee, S.-P., Feil, R., Fisher, M. C., Dealy, C. N., Potter, L. R., & Jaffe, L. A. (2017). Dephosphorylation of the NPR2 guanylyl cyclase contributes to inhibition of bone growth by fibroblast growth factor. *ELife*, 6, 313–319.
249. Sifakis, S., Androutsopoulos, V. P., Tsatsakis, A. M., & Spandidos, D. A. (2017). Human exposure to endocrine disrupting chemicals: Effects on the male and female reproductive systems. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 51, 56–70.
250. Silva, S., A. Rodrigues, J., Rosário Coelho, M., Martins, A., Cardoso, E., Vale Cardoso, V., João Benoliel, M., & M. Almeida, C. M. (2021). Occurrence of pharmaceutical active compounds in sewage sludge from two urban wastewater treatment plants and their potential behaviour in agricultural soils. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 7(5), 969–982.
251. Skinner, M. K. (2008). What is an epigenetic transgenerational phenotype?: F3 or F2. *Reproductive Toxicology*, 25(1), 2–6.
252. Skinner, M. K. (2014). Environmental stress and epigenetic transgenerational inheritance. *BMC Medicine*, 12(1), 153–154.
253. So, C., Menelaou, K., Uraji, J., Harasimov, K., Steyer, A. M., Seres, K. B., Bucevičius, J., Lukinavičius, G., Möbius, W., Sibold, C., Tandler-Schneider, A., Eckel, H., Moltrecht, R., Blayney, M., Elder, K., & Schuh, M. (2022). Mechanism of spindle pole organization and instability in human oocytes. *Science*, 375(6581), 39–44.
254. Solc, P., Kitajima, T. S., Yoshida, S., Brzakova, A., Kaido, M., Baran, V., Mayer, A., Samalova, P., Motlik, J., & Ellenberg, J. (2015). Multiple requirements of PLK1 during mouse oocyte maturation. *PloS One*, 10(2), 0116–123.
255. Sorensen, R. A., Cyert, M. S., & Pedersen, R. A. (1985). Active maturation-promoting factor is present in mature mouse oocytes. *Journal of Cell Biology*, 100(5), 1637–1640.
256. Soyak, S. M., Amleh, A., & Dean, J. (2000). FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*, 127(21), 4645–4654.
257. Stojkovic, M., Machado, S. A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Gonçalves, P. B., & Wolf, E. (2001). Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After

- In Vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 64(3), 904–909.
258. Su, Y.-Q., Sugiura, K., Wigglesworth, K., O'Brien, M. J., Affourtit, J. P., Pangas, S. A., Matzuk, M. M., & Eppig, J. J. (2008). Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*, 135(1), 111–121.
259. Sugiura, K., Pendola, F. L., & Eppig, J. J. (2005). Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: Energy metabolism. *Developmental Biology*, 279(1), 20–30.
260. Sun, Q.-Y., Blumenfeld, Z., Rubinstein, S., Goldman, S., Gonen, Y., & Breitbart, H. (1999). Mitogen-activated protein kinase in human eggs. *Zygote*, 7(2), 181–185.
261. Susiarjo, M., Xin, F., Bansal, A., Stefaniak, M., Li, C., Simmons, R. A., & Bartolomei, M. S. (2015). Bisphenol a exposure disrupts metabolic health across multiple generations in the mouse. *Endocrinology*, 156(6), 2049–2058.
262. Tan, J.-H., Wang, H.-L., Sun, X.-S., Liu, Y., Sui, H.-S., & Zhang, J. (2009). Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Molecular Human Reproduction*, 15(1), 1–9.
263. Tarazona, A., Rodríguez, J., Restrepo, L., & Olivera-Angel, M. (2006). Mitochondrial Activity, Distribution and Segregation in Bovine Oocytes and in Embryos Produced in Vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(1), 5–11.
264. Tasaki, H., Iwata, H., Sato, D., Monji, Y., & Kuwayama, T. (2013). Estradiol has a major role in antrum formation of porcine preantral follicles cultured in vitro. *Theriogenology*, 79(5), 809–814.
265. ter Burg, W., Bouma, K., Schakel, D. J., Wijnhoven, S. W. P., van Engelen, J., van Loveren, H., & Ezendam, J. (2014). Assessment of the risk of respiratory sensitization from fragrance allergens released by air fresheners. *Inhalation Toxicology*, 26(5), 310–318.
266. Tesařík, J., Kopečný, V., Plachot, M., & Mandelbaum, J. (1988). Early morphological signs of embryonic genome expression in human preimplantation development as revealed by quantitative electron microscopy. *Developmental Biology*, 128(1), 15–20.
267. Titus-Ernstoff, L., Troisi, R., Hatch, E. E., Wise, L. A., Palmer, J., Hyer, M., Kaufman, R., Adam, E., Strohsnitter, W., Noller, K., Herbst, A. L., Gibson-Chambers, J., Hartge, P., & Hoover, R. N. (2006). Menstrual and reproductive characteristics of women whose mothers were exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). *International Journal of Epidemiology*, 35(4), 862–868.
268. Törnell, J., Billig, H., & Hillensjö, T. (1990). Resumption of rat oocyte meiosis is paralleled by a decrease in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) and is inhibited by microinjection of cGMP. *Acta Physiologica Scandinavica*, 139(3), 511–517.
269. Torner, H., Brüssow, K.-P., Alm, H., Ratky, J., Pöhland, R., Tuchscherer, A., & Kanitz, W. (2004). Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology*, 61(9), 1675–1689.
270. Tucker, K. L., Beard, C., Dausmann, J., Jackson-Grusby, L., Laird, P. W., Lei, H., Li, E., & Jaenisch, R. (1996). Germ-line passage is required for establishment of methylation and expression patterns of imprinted but not of nonimprinted genes. *Genes & Development*, 10(8), 1008–1020.
271. 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 cytostatic factor arrest of *Xenopus* eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(12), 4318–4323.
272. Uter, W., Johansen, J. D., Börje, A., Karlberg, A.-T., Lidén, C., Rastogi, S., Roberts, D., & White, I. R. (2013). Categorization of fragrance contact allergens for prioritization of preventive measures: Clinical and experimental data and consideration of structure–activity relationships. *Contact Dermatitis*, 69(4),
273. Van Blerkom, J., Davis, P. W., & Merriam, J. (1994). A retrospective analysis of unfertilized and presumed

- parthenogenetically activated human oocytes demonstrates a high frequency of sperm penetration. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 9(12), 2381–2388.
274. Van den Belt, K., Wester, P. W., van der Ven, L. T. M., Verheyen, R., & Witters, H. (2002). Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): Time dependency and reversibility. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(4), 767–775.
275. Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Jr., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., & Myers, J. P. (2012a). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*, 33(3), 378–455.
276. Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Jr., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., & Myers, J. P. (2012b). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*, 33(3), 378–455.
277. Vanderfyden, B. C., Telfer, E. E., & Eppig, J. J. (1992). Mouse Oocytes Promote Proliferation of Granulosa Cells from Preantral and Antral Follicles in Vitro<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 46(6), 1196–1204.
278. Vassalli, J. D., Huarte, J., Belin, D., Gubler, P., Vassalli, A., O'Connell, M. L., Parton, L. A., Rickles, R. J., & Strickland, S. (1989). Regulated polyadenylation controls mRNA translation during meiotic maturation of mouse oocytes. *Genes & Development*, 3(12b), 2163–2171.
279. Vastenhouw, N. L., & Schier, A. F. (2012). Bivalent histone modifications in early embryogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(3), 374–386.
280. Veldhoen, N., Skirrow, R. C., Osachoff, H., Wigmore, H., Clapson, D. J., Gunderson, M. P., Van Aggelen, G., & Helbing, C. C. (2006). The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquatic Toxicology*, 80(3), 217–227.
281. Vitullo, A. D., & Ozil, J.-P. (1992). Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Developmental Biology*, 151(1), 128–136.
282. Vorlaufer, E., & Peters, J.-M. (1998). Regulation of the Cyclin B Degradation System by an Inhibitor of Mitotic Proteolysis. *Molecular Biology of the Cell*, 9(7), 1817–1831.
283. Waddington, C. H. (1942). The epigenotype. *International Journal of Epidemiology*, 41(1), 10–13.
284. 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), 3554–3565.
285. Wassarman, P. M. (2008). Zona Pellucida Glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(36), 2285–2289.
286. 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.
287. Wehrend, A., & Meinecke, B. (2001). Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: Species specific differences in the length of the meiotic stages. *Animal Reproduction Science*, 66(3), 175–184.
288. Wessel, G. M., Brooks, J. M., Green, E., Haley, S., Voronina, E., Wong, J., Zaydfudim, V., & Conner, S. (2001). The biology of cortical granules. In *International Review of Cytology* (Vol. 209, pp. 117–206). Academic Press.
289. Wessel, G. M., Conner, S. D., & Berg, L. (2002). Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the sea urchin oocyte. *Development*, 129(18), 4315–4325.
290. Wilding, M., Dale, B., Marino, M., di Matteo, L., Alviggi, C., Pisaturo, M. L., Lombardi, L., & De Placido, G.

- (2001). Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*, 16(5), 909–917.
291. Witchi, E. (1948). Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Contrib Embryol Carnegie Inst*, 32, 67–80. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10007342215/>
292. Wolff, M. S., Teitelbaum, S. L., McGovern, K., Pinney, S. M., Windham, G. C., Galvez, M., Pajak, A., Rybak, M., Calafat, A. M., Kushi, L. H., & Biro, F. M. (2015). Environmental phenols and pubertal development in girls. *Environment International*, 84, 174–180.
293. World Health Organization, United Nations Environment Programme, Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals, Bergman, Å., Heindel, J. J., Jobling, S., Kidd, K., & Zoeller, T. R. (2013). *State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012: Summary for decision-makers*. World Health Organization; WHO IRIS.
294. Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T. A., Kwon, S. Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A. J., Chait, B. T., Badenhorst, P., Wu, C., & Allis, C. D. (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*, 442(7098), 86–90.
295. Xiao, S., Diao, H., Smith, M. A., Song, X., & Ye, X. (2011). Preimplantation exposure to bisphenol A (BPA) affects embryo transport, preimplantation embryo development, and uterine receptivity in mice. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 32(4), 434–441.
296. Xin, F., Susiarjo, M., & Bartolomei, M. S. (2015). Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation? *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 43, 66–75.
297. Yan, L., Yang, M., Guo, H., Yang, L., Wu, J., Li, R., Liu, P., Lian, Y., Zheng, X., Yan, J., Huang, J., Li, M., Wu, X., Wen, L., Lao, K., Li, R., Qiao, J., & Tang, F. (2013). Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(9), 1131–1139.
298. Yanagimachi, R. (1988). Mammalian Fertilization. *New York: Raven Press.*, 230 – 278(In: Knobil E, Neill J (eds.): The Physiology of Reproduction).
299. Yoder, J. A., Walsh, C. P., & Bestor, T. H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics*, 13(8), 335–340.
300. Yu, Y., Dumollard, R., Rossbach, A., Lai, F. A., & Swann, K. (2010). Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *Journal of Cellular Physiology*, 224(3), 672–680.
301. Yurewicz, E. C., Sacco, A. G., Gupta, S. K., Xu, N., & Gage, D. A. (1998). Hetero-oligomerization-dependent Binding of Pig Oocyte Zona Pellucida Glycoproteins ZPB and ZPC to Boar Sperm Membrane Vesicles \*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(13), 7488–7494.
302. Žalmanová, T., Hošková, K., Nevorál, 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, 485–490.
303. Zeng, M.-H., Wang, Y., Huang, H.-L., Quan, R.-P., Yang, J.-T., Guo, D., Sun, Y., Lv, C., Li, T.-Y., Wang, L., Tan, H.-J., Long, P.-P., Deng, H.-W., & Xiao, H.-M. (2021). Zp4 is completely dispensable for fertility in female rats†. *Biology of Reproduction*, 104(6), 1282–1291.
304. Zhang, M., Su, Y.-Q., Sugiura, K., Wigglesworth, K., Xia, G., & Eppig, J. J. (2011). Estradiol Promotes and Maintains Cumulus Cell Expression of Natriuretic Peptide Receptor 2 (NPR2) and Meiotic Arrest in Mouse Oocytes In Vitro. *Endocrinology*, 152(11), 4377–4385.
305. Zhang, X., Gao, Y., Li, Q., Li, G., Guo, Q., & Yan, C. (2011). Estrogenic Compounds and Estrogenicity in Surface Water, Sediments, and Organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(1), 93–100.
306. Zhou, C., Gao, L., & Flaws, J. A. (2017). Prenatal exposure to an environmentally relevant phthalate mixture

- disrupts reproduction in F1 female mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 318, 49–57.
307. Zuccotti, M., Piccinelli, A., Rossi, P. G., Garagna, S., & Redi, C. A. (1995). Chromatin organization during mouse oocyte growth. *Molecular Reproduction and Development*, 41(4), 479–485.