

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Reprodukční a vývojová biologie



Bc. Johana Straková

Vliv triclosanu na průběh meiotického zrání prasečích oocytů *in vitro*
The effect of triclosan on *in vitro* meiotic maturation of porcine oocytes

Diplomová práce

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

Praha, 2024

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 nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29. 4. 2024

Bc. Johana Straková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce panu prof. Ing. Jaroslavu Petrovi, DrSc., za jeho odborné rady při psaní této práce a vstřícnost, se kterou předává své zkušenosti dál. Také bych ráda poděkovala svým konzultantkám Ing. Tereze Žalmanové, Ph.D., a Ing. Šárce Prokešové, Ph.D., za jejich laskavý přístup, a především čas a energii, které mi věnovaly. Děkuji také své rodině a svému partnerovi za jejich podporu během celého studia.

Abstrakt

Meiotická maturace oocytů je klíčovou fází vývoje samičích gamet. Do přirozené fyziologie oogeneze a meiotické maturace v současné době zasahuje množství antropogenních látek kontaminujících životní prostředí. Mezi tyto sloučeniny patří také triclosan. Triclosan (5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol) je antibakteriální látka komerčně využívaná v kosmetických a dezinfekčních přípravcích. Do lidského organismu vstupuje tato sloučenina absorpcí přes kůži a sliznice a její přítomnost byla prokázána v krvi, moči, mateřském mléku, játrech a tukové tkáni. Triclosan je klasifikován jako endokrinní disruptor, přesto jeho spotřeba celosvětově stále stoupá. Cílem této práce je zhodnotit vliv nízkých dávek triclosanu na vybrané markery meiotického zrání prasečích oocytu *in vitro*.

Tato práce popisuje negativní účinky triclosanu a triclosanu v kombinaci s bisphenolem S na meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*. Dále byl prokázán vliv těchto látek na zvýšené procento abnormálních meiotických vřetének a stabilitu mikrotubulů meiotického vřeténka. Vliv na mitochondrie a epigenetické vlivy triclosanu nebyly prokázány. Výsledky poukazují na rizika spojená s komerčním využitím triclosanu a nutnost dalšího studia jeho vlivu na reprodukční zdraví živočichů včetně člověka.

Klíčová slova

triclosan, endokrinní disruptor, oocyt, meiotické zrání, prase

Abstract

Meiotic maturation of oocytes is a key phase in the development of female gametes. The natural physiology of oogenesis and meiotic maturation is currently being influenced by a number of anthropogenic environmental contaminants. These compounds include triclosan. Triclosan (5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol) is an antibacterial substance commercially used in cosmetic and disinfectant products. This compound enters the human body by absorption through the skin and mucous membranes. Its presence has been demonstrated in blood, urine, breast milk, liver and adipose tissue. Triclosan is classified as an endocrine disruptor, yet its consumption continues to increase worldwide. The aim of this study is to evaluate the effect of low doses of triclosan on selected markers of meiotic maturation of porcine oocytes *in vitro*.

This work describes the negative effects of triclosan and triclosan in combination with bisphenol S on the meiotic maturation of porcine oocytes *in vitro*. Furthermore, the effect of these substances on the increased percentage of abnormal meiotic spindles and the stability of the microtubules of the meiotic spindle was demonstrated. Effects on mitochondria and epigenetic effects of triclosan were not proved. The results highlight the risks associated with the commercial use of triclosan and the need for further study of its impact on the reproductive health of animals, including humans.

Key words

triclosan, endocrine disruptor, oocyte, meiotic maturation, pig

Obsah

Úvod.....	1
1. Oogeneze.....	2
1.1. Fáze množení.....	2
1.2. Fáze růstu oocyty.....	4
1.3. Fáze zrání.....	5
1.3.1. Meiotická kompetence.....	5
1.3.2. Meiotické zrání.....	6
1.4. Folikulogeneze.....	10
2. Vybrané faktory a markery regulace meiotického zrání.....	13
2.1. Maturation promoting factor MPF.....	13
2.2. Cytostatic factor CSF.....	13
2.3. MAPK.....	14
2.4. Pohlavní hormony.....	14
2.5. H3K4me2.....	16
2.6. 5-methylcytosin.....	16
2.7. Sirtuin 3.....	17
2.8. TOMM20.....	18
2.9. Acetyl- α -tubulin.....	18
3. Reprodukčně toxické látky.....	19
3.1. Endokrinní disruptory.....	19
4. Triclosan.....	23
5. Hypotéza a cíle práce.....	26
6. Materiály a metodika.....	27
6.1. Chemikálie.....	27
6.2. Získávání a izolace oocytů.....	28
6.3. Kultivace oocytů.....	28
6.4. Fixování oocytů.....	28
6.5. Imunocytochemické barvení.....	29
6.5.1. Lokalizace α -tubulinu.....	29
6.5.2. Lokalizace Acetyl- α -tubulinu.....	29
6.5.3. Lokalizace SIRT3.....	29
6.5.4. Lokalizace TOMM20.....	30
6.5.5. Lokalizace H3K4me2.....	30
6.5.6. Lokalizace 5mC.....	30

6.6. Fluorescenční mikroskopie a analýza obrazu.....	30
6.7. Statistická analýza	30
7. Výsledky.....	32
7.1. Vliv triclosanu na meiotické zrání prasečích oocytů <i>in vitro</i>	32
7.2. Vliv triclosanu na utváření cytoskeletárních struktur meiotického vřeténka	33
7.3. Vliv triclosanu na acetylaci α -tubulinu a stabilitu mikrotubulů meiotického vřeténka.....	35
7.4. Vliv triclosanu na expresi a kvalitu mitochondrií během meiotického zrání	36
7.5. Vliv triclosanu na změny v epigenetických modifikacích H3K4me2 a 5mC.....	38
7.6. Vliv triclosanu v kombinaci s 3 pM bisphenolem S na meiotické zrání prasečích oocytů <i>in vitro</i>	40
7.7. Vliv triclosanu v kombinaci s 3 pM bisphenolem S na utváření cytoskeletárních struktur meiotického vřeténka	41
7.8. Vliv triclosanu v kombinaci s 3pM bisphenolem S na acetylaci.....	43
α -tubulinu a stabilitu mikrotubulů meiotického vřeténka	43
8. Diskuze.....	45
9. Závěr.....	53
10. Zdroje citované literatury	54

Seznam zkratek

2,8-DCDD – 2,8-dichlorodibenzo-P-dioxin

5mC – 5-Methylcytosine, 5-methylcytosin

AR – Androgen Receptor, androgenní receptor

Arp2/3 – Actin Related Protein 2/3, aktin asociovaný protein 2/3

ATP – Adenosine triphosphate, adenosintrifosfát

Blimp1 – B-lymphocyte-induced maturation protein 1, B-lymfocyty indukovaný maturační protein 1

BMP – Bone morphogenetic protein, kostní morfogenetický protein

BMP15 – Bone morphogenetic protein 15, kostní morfogenetický protein 15

BMP4 – Bone morphogenetic protein 4, kostní morfogenetický protein 4

BMP7 – Bone morphogenetic protein 7, kostní morfogenetický protein 7

BPA – Bisphenol A

BPS – Bisphenol S

Bub1 – Budding inhibited by benzimidazoles 1

cAMP – Cyclic adenosine monophosphate, cyklický adenosinmonofosfát

CDC25 – Cell Division Cycle Phosphatase 25, fosfatáza buněčného cyklu 25

CDK1 – Cyclin-dependent kinase 1, cyklin dependentní kináza 1

Cep152 – Centrosomal Protein 152, centrozomální protein 152

Cep192 - Centrosomal Protein 192, centrozomální protein 192

cGMP – Cyclic guanosine monophosphate, cyklický guanosinmonofosfát

COC – Cumulus-oocyte complex, kumulo-oocytární komplex

CSF – Cytostatic Factor, cytostatický faktor

Cx37 – Connexin 37, konexin 37

Cx43 – Connexin 43, konexin 43

DDT - dichlordifenyltrichlorethan

DNMT1 – DNA Methyltransferase 1, DNA methyltransferáza 1

DNMT3A – DNA Methyltransferase 3A, DNA methyltransferáza 3A

DNMT3B – DNA Methyltransferase 3B, DNA methyltransferáza 3B

ED – Endocrine disruptor, endokrinní disruptor

Emi2 – Endogenous Meiotic Inhibitor 2, endogenní meiotický inhibitor 2

ER – Endoplasmic reticulum, endoplazmatické retikulum

ERE – Estrogen Response Element, estrogenový responzivní element

ERK1/2 – Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2, extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2

ERR γ – Estrogen-Related Receptor Gamma, s estrogenem asociovaný receptor gamma

ER α – Estrogen Receptor α , estrogenní receptor α

ER β – Estrogen Receptor β , estrogenní receptor β

FabI – Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase I

FIGLA – Folliculogenesis-specific basic helix-loop-helix, pro folikulogenezi specifický helix-loop-helix

FOXL2 – Forkhead box protein L2

FSH – Follicle-stimulating hormone, folikulostimulační hormon

GDF9 – Growth differentiation factor 9, růstový diferenciační faktor 9

GnRH – Gonadotropin-Releasing Hormone, gonadotropiny uvolňující hormon

GP1R – G Protein Coupled Estrogen Receptor 1, s G proteinem spjatý estrogenní receptor 1

GV – Germinal vesicle, zárodečný váček

GVBD – Germinal Vesicle Breakdown, rozpad zárodečného váčku

H3K4me2 – Histone H3 dimethylated at Lysine 4, histon H3 dimetylovaný na lysinu 4

hCG – Human Chorionic Gonadotropin, lidský choriový gonadotropin

HPG osa – Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis, osa hypothalamus-hypofýza-gonády

KDM - Histone Lysine Demethylase, histon lysin demethyláza

KIF11 – Kinesin 11, kinezin 11

KMT - Histone Lysine Methyltransferase, histon lysin methyltransferáza

LH – Luteinizing hormone, luteinizační hormon

Mad1 – Mitotic Arrest Defficient 1

Mad2 - Mitotic Arrest Defficient 2

MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase, mitogenem aktivovaná proteinkináza

MAPs – Microtubule Associated Proteins, s mikrotubuly asociované proteiny

MEK – MAPK/ERK Kinase

MPF – Maturation Promoting Factor, maturaci podporující faktor

mtDNA – Mitochondrial DNA, mitochondriální DNA

MTOC – Microtubule Organizing Center, mikrotubuly organizující centra

NAD⁺/NADH- Nicotinamide Adenine Dinucleotide, nikotin adenin dinukleotid

NEDD1 - Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 1

NSN – Non-surrounded nucleolus, neobklopující jádérko

NuMA – Nuclear Mitotic Apparatus, protein jaderného mitotického aparátu

P450 scc – Cholesterol Side Chain Cleavage Enzyme

PCO – Polycystic Ovary, polycystické vaječníky

PCOS – Polycystic Ovary Syndrome, syndrom polycystických vaječníků

PDE3A – Phosphodiesterase 3A, fosfodiesteráza 3A

PGCs – Primordial germ cells, primordiální zárodečné buňky

PKA – Protein Kinase A, proteinkináza A

Plk1 – Polo-Like Kinase 1, polokináza 1

Plk4 – Polo-Like Kinase 4, polokináza 4

POI – Primary Ovarian Insufficiency, primární ovariální insuficience

PP1 – Protein phosphatase 1, proteinfosfatáza 1

PP2A – Protein phosphatase 2A, proteinfosfatáza 2A

PR – Progesterone Receptor, progesteronový receptor

PRE – Progesteron Response Element, progesteronový responzivní element

Ran-GTP – Ras-related Nuclear Protein, jaderný protein asociovaný s Ras

ROS – Reactive Oxygen Species, reaktivní formy kyslíku

Rsk – Ribosomal S6 kinase, ribozomální S6 kináza

SAC – Spindle Assembly Checkpoint, kontrolní bod sestavení dělicího vřeténka

SDF-1 – Stromal cell-derived factor 1, faktor 1 odvozený od stromálních buněk

SIRT3 – Sirtuin 3

Smad – Suppressor of mothers against Decapentaplegic

SN – Surrounded nucleolus, obklopující jádérko

Sox17 – SRY-box 17 protein

StAR – Steroidogenic Acute Regulatory Protein, steroidní akutní regulační protein

T3 – Triiodothyronine, trijodtyronin

T4 – Tetraiodothyronine, tetrajodtyronin

TGF β – Transforming growth factor β , transformující růstový faktor β

TNAP – Tissue-nonspecific alkaline phosphatase, tkáňově nespecifická alkalická fosfatáza

TOMM20 - Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20, translokáza vnější mitochondriální membrány 20

TPX2 - Targeting protein for Xklp2, cílový protein pro Xklp2

Wee1 – Wee1 kinase, Wee1 kináza

WNT - Wingless

ZP – *Zona pellucida*

γ TuRC – Gamma-Tubulin Ring Complex, gamma-tubulinový ring komplex

Úvod

V životním prostředí se díky činnosti člověka vyskytuje množství antropogenních látek, které jsou pro organismus toxické. Tyto sloučeniny se akumulují ve vodě a půdě, a přestože nevykazují akutní toxicitu, jsou při dlouhodobé expozici pro živočichy včetně člověka škodlivé. Do popředí zájmu se v posledních letech dostávají reprodukčně toxické látky a endokrinní disruptory (ED). ED vykazují negativní účinky narušením fyziologie systému endokrinních hormonů a díky tomu negativně působí na reprodukční funkce organismu živočichů. Mezi hojně studované ED patří kromě jiných také triclosan, kterým se zabývá tato práce. Triclosan je antibakteriální látka, která se komerčně využívá v dezinfekčních a kosmetických přípravcích. Z tohoto důvodu spotřeba triclosanu v posledních letech stoupá zejména v souvislosti s koronavirovou pandemií. V prostředí se triclosan v poměrně vysokých koncentracích vyskytuje v povrchových vodách, odkud se může dostat do pitné vody a potravy. Odtud se pak absorbuje do organismu přes kůži a sliznice a částečně se může v organismu akumulovat. Triclosan byl u člověka detekován v krvi, moči, tukové tkáni, játrech a mateřském mléce. První studie naznačují, že triclosan je ED a díky své interferenci s endokrinním systémem negativně ovlivňuje funkce reprodukční soustavy.

Tato práce studuje vliv triclosanu na oogenezi, konkrétně na meiotickou maturaci oocyty. Meiotická maturace je velmi komplikovaný proces regulovaný organismem na mnoha úrovních, a proto i malé změny v regulaci meiotické maturace mohou vést k výrazným poruchám vývoje oocyty a vyústit v problémy s plodností. Práce se zaměřuje na schopnost oocyty dokončit meiotické zrání pod vlivem nízkých dávek triclosanu vyskytujících se v prostředí. Dále také na jednotlivé markery meiotického zrání, mezi které patří utváření bipolárního meiotického vřeténka, počet mitochondrií a epigenetické modifikace DNA. Po ověření účinků samotného triclosanu testujeme také vliv triclosanu v kombinaci s dalším ED bisphenolem S. Tyto ED se ve výrobcích i prostředí často vyskytují společně a je tak vysoká šance vystavení organismu kombinaci právě těchto ED. Jako experimentální model bylo zvoleno prase pro podobnost s člověkem ve fyziologii ale také v samotné oogenezi a meiotické maturaci.

1. Oogeneze

Oogeneze je komplexní vývojový proces, který dává vzniknout oocytu jako vysoce specializované samičí pohlavní buňce. U savců je možné rozdělit vývoj oocytu obecně do tří fází. Fáze množení začíná u samic savců prenatalně a je charakteristická migrací a proliferací primordiálních zárodečných buněk. Fáze růstu je zahájena prenatalně, ale pokračuje i postnatalně a zahrnuje růst oocytu a folikulu. Fáze zrání, která probíhá v období pohlavní dospělosti, je specifikována meiotickým dělením a zráním cytoplasmy, což umožňuje vývoj oocytu schopného oplození (Black & Erickson, 1968; Van Den Hurk & Zhao, 2005).

1.1. Fáze množení

Oogeneze začíná u savců prenatalně v období utváření primitivního proužku. Pohlavní buňky vznikají z prekursorů zvaných primordiální zárodečné buňky (PGCs – Primordial Germ Cells). PGCs jsou populací totipotentních buněk, které se oddělují z proximálního epiblastu procesem indukce. Následně migrují skrz primitivní entoderm do genitálních lišt, oblasti budoucích gonád (Anderson et al., 2000; Tam & Snow, 1981). Migrace PGCs podél entodermu primitivního střeva probíhá díky interakcím s okolními somatickými buňkami a extracelulární matrix (Raz, 2004).

Vývoj PGCs je u savců nejpodrobněji popsán u myši a většina poznatků, které jsou dosud o vývoji PGCs známy, byly objeveny a popsány právě na tomto živočichovi. K indukci myších PGCs dochází před gastrulací ve stadiu vývoje embryonálního dne 6,5 – 7,5 (McLaren & Lawson, 2005). Populace PGCs se odděluje v oblasti proximálního epiblastu na základě signálů z extraembryonálního ektodermu. Jednou z hlavních součástí signalizace je exprese faktorů z rodiny BMP (Bone Morphogenic Protein, kostní morfogenetický protein) buňkami extraembryonálního ektodermu. Konkrétně se jedná o BMP4 a BMP8 (Lawson et al., 1999; Ying et al., 2001). BMP faktory interagují s efekty ze superrodiny TGF β – konkrétně Smad1, 4 a 5 a dochází tak k indukci specifikace PGCs v epiblastu (Chang & Matzuk, 2001; Chu et al., 2004; Tremblay et al., 2001).

Dále dochází k represí somatického programu v těchto buňkách. Jedním z klíčových faktorů pro tento proces je Blimp1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1, B lymfocyty indukovaný maturační protein), který je represorem transkripce Hox genů a je zároveň časným markerem populace PGCs. Exprese transkripčního regulátoru Blimp1 je zřejmě regulována BMP4 signální dráhou (Ohinata et al., 2005; Vincent et al., 2005). Kromě Blimp1 PGCs exprimují také Prdm14, který je klíčovým regulátorem epigenetického reprogramování

v těchto buňkách (Yamaji et al., 2008). Dalšími faktory specifickými pro PGCs jsou fragilis, stella a TNAP (Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase, tkáňově nespecifická alkalická fosfatáza) (Saitou et al., 2002).

Indukce prasečích PGCs začíná v epiblastu během gastrulace přibližně v období embryonálního dne 11,5. Pro specifikaci PGCs jsou klíčové BMP a WNT signální dráhy v posteriorní oblasti epiblastu. Expres BMP a WNT spouští expresi faktorů Sox17 a Blimp1, které přispívají ke specifikaci populace PGCs a indukují epigenetické reprogramování zárodečných buněk (Kobayashi et al., 2017).

U člověka dochází k indukci PGCs z oblasti epiblastu v období embryonálního dne 11 zejména díky BMP signalizaci v oblasti primitivního entodermu. Pro specifikaci lidských PGCs jsou stejně jako u prasete důležité faktory Sox17 a Blimp1 (De Felici, 2016).

Ustálená populace PGCs poté aktivně migruje do oblasti embryonálního entodermu. Následuje migrace podél vyvíjejícího se střeva až do oblasti dorzálního mesenteria, odkud PGCs migrují do mezodermu. U prasete se PGCs začínají objevovat v oblasti genitálních lišt 24 dní po oplození. Bylo prokázáno, že PGCs vycestovávají z oblasti střeva jako samostatné buňky, ale následně v oblasti dorzálního mesenteria dochází k jejich kontaktu. Během migrace do genitálních lišt jsou PGCs spojeny cytoplasmatickými výběžky a tvoří shluky (Bielańska-Osuchowska, 2006; Gomperts et al., 1994). Kontakty mezi PGCs jsou zřejmě zprostředkovány zejména pomocí transmembránových proteinů kadherinů a dalších signálních molekul, které jsou kadheriny ovlivněny (Bendel-Stenzel et al., 2000; Okamura et al., 2003). Pro aktivní migraci jsou nezbytné chemokiny, zejména SDF-1 (Stromal Cell-Derived Factor 1, faktor 1 odvozený od stromálních buněk), který je produkován okolními somatickými buňkami (Ara et al., 2003).

V oblasti genitálních lišt ztrácejí PGCs motilitu a následně zahajují proliferaci. Díky mnohonásobným mitózám bez cytokineze vznikají shluky buněk zvané germ cell nests (shluky zárodečných buněk) (Pepling & C. Spradling, 1998). Jádra germ cell nests vstupují postupně od anterioru k posterioru do meiotického dělení a vznikají tak primární oocyty (Menke et al., 2003). Během tranzice z mitotického na meiotické dělení dochází k apoptóze značného procenta oocytů. To je zřejmě mechanismus pro eliminaci méně kvalitních buněk (Baker, 1963). Primární oocyty se meioticky vyvíjí v profázi I přes leptotene, zygotene, pachytene až do diplotene, kdy je meióza zastavena (Borum, 1961). Během profáze I dochází k párování homologních chromozomů a tvorbě synapsí pomocí synaptonemálního komplexu. Následně probíhá proces homologní rekombinace, chromozomy zůstávají spojeny v místech chiasmat a v diplotene profáze I vstupují oocyty do I. meiotického bloku. Oocyty u savců

setrvávají v meiotickém bloku až do období pohlavní dospělosti (Bielańska-Osuchowska, 2006; Wang & Pepling, 2021). Germ cell nests jsou obklopeny somatickými buňkami, které během meiózy postupně invadují do shluků a rozrušují jejich strukturu. Tento jev je známý jako germ cell nests breakdown a dává vznik primordiálním folikulům s jednou vrstvou granulóznicích buněk a primárním oocytem meioticky zastaveným v diplotene profáze I (Pepling & Spradling, 2001).

1.2. Fáze růstu oocyty

K zahájení růstu dochází v období pohlavní dospělosti samice, kdy v průběhu ovariálního cyklu zahájí růst hned několik primárních oocytů. Během růstové fáze zvětší prasečí oocyt svůj průměr přibližně z 30 na 120 μm , dochází k nárůstu objemu cytoplasmy a dalším procesům nutným k získání meiotické kompetence (Motlík & Fulka, 1986). Pro růstovou fázi je důležitá interakce oocyty a okolních somatických buněk, které výrazně proliferují (Thomas et al., 2005).

Během růstové fáze oocyty dochází k redistribuci a tvorbě nových organel. Jedním z důležitých procesů je organizace mitochondrií. Ty jsou klíčovou organelou nejen pro oocyt, ale také pro budoucí embryo, jelikož jsou děděny maternálně. Během růstové fáze se významně navyšuje počet mitochondrií. Dochází také ke změnám ve struktuře, mitochondrie v růstové fázi jsou více vakuolizované s vyklenutými kristami (Picton et al., 1998; Yildirim & Seli, 2024). Ke konci růstové fáze jsou mitochondrie u prasečího oocyty lokalizovány zejména okolo jádra oocyty a méně v periferní cytoplasmě (Sun et al., 2001).

Během růstové fáze dochází k výrazné syntéze RNA, která je po oplození využívána embryem před aktivací embryonálního genomu. Na základě specifík vývoje oocyty využívá tato buňka mechanismy pro regulaci syntézy, translace a degradace RNA na základě potřeb v různých fázích vývoje (Bjerregaard, 2003; Piko & Clegg, 1982). Jedním ze způsobů regulace je polyadenylace, která reguluje délku polyA oblasti mRNA, a tím její stabilitu (Bachvarova, 1992). V oocyty existují různé způsoby polyadenylace a na základě specifických sekvencí v polyA oblasti může být rozlišena stabilita jednotlivých RNA a jejich translace v časovém horizontu vývoje oocyty a embrya (Vassalli et al., 1989; Verrotti et al., 1996).

Golgiho aparát zvětšuje svůj celkový objem a rozpadá se na množství zploštělých váčků které jsou lokalizovány pod plazmatickou membránou. Tady Golgiho aparát slouží jako zdroj glykoproteinů pro tvorbu *Zona pellucida* (ZP) (Greve et al., 1982). ZP je extracelulární

glykoproteinový obal oocytu, k jehož syntéze dochází právě v období růstu oocytu. Tato vrstva extracelulární matrix plní funkci ochranného obalu, a kromě toho její proteiny hrají důležitou roli při oplození a interakci spermie s oocytem. U prasečích oocytů je ZP složena stejně jako u většiny ostatních savců ze tří rodin glykoproteinů – ZP1, ZP2 a ZP3 (Prasad et al., 2000). Obecně u většiny savců tvoří proteiny ZP2 a ZP3 dimery, které jsou nekovalentně propojeny proteiny ZP1 (Wassarman et al., 1996). Golgiho aparát přispívá také ke tvorbě kortikálních granul, která se později během zrání lokalizují pod membránu a při oplození zabraňují polyspermii (Ducibella et al., 1994).

Během růstu oocytu dochází také ke ztrátě centriol. Tento proces je studován zejména u myši, kde jsou centrioly přítomné do pachytene v profázi I, pak dochází k jejich degradaci (Szollosi et al., 1972). Ke ztrátě centriol ovšem dochází i u oocytů jiných savců včetně prasete (Schatten & Sun, 2011). Během meiotického dělení tak jako mikrotubuly organizující centra (MTOC) fungují různé kompartmenty cytoplasmy a proteiny pericentriolární matrix perzistující v cytoplasmě (Merdes & Cleveland, 1997). Centrioly se znovu objevují až po oplození oocytu, kdy jsou přineseny spermií. Ztráta centriol je zřejmě evolučně konzervována pro zabránění partenogenetické aktivace embrya a zabránění nekontrolovatelnému zmnožení centrozomů, které by vedlo k chybnému sestavení dělicího vřeténka (Manandhar et al., 2005).

Kromě cytoplasmy jsou patrné změny také v jádře. Zde probíhají dynamické přestavby v architektuře chromatinu a dochází k jeho modifikacím a kondenzaci. Jádro oocytu je ve stadiu GV0 (Lodde et al., 2008).

1.3. Fáze zrání

1.3.1. Meiotická kompetence

Meiotickou kompetenci získává oocyt během růstové fáze. Díky probíhajícím jaderným a cytoplasmatickým změnám oocyt postupně získává schopnost znovuzahájit meiotické dělení, které je zastaveno v profázi I. U prasnic bylo pozorováno, že meioticky kompetentní oocyty dosahují velikosti minimálně 120 μm a folikuly minimálně 3 mm v průměru. Při *in vitro* oplození vznikne ovšem vyšší procento úspěšně se vyvíjejících embryí při použití oocytů izolovaných z folikulů větších než 3 mm. (Marchal et al., 2002; Motlík et al., 1984). Malé procento prasečích oocytů izolovaných z nezralých folikulů je schopné znovuzahájení meiózy, ale nedochází k jejímu úspěšnému dokončení (Motlík & Fulka, 1986). To je rozdíl oproti oocytům hlodavců, které často mohou dokončit obě meiotická dělení jako částečně meioticky

kompetentní (Zuccotti et al., 1998). Kromě samotné velikosti oocytu a folikulu je ukazatelem meiotické kompetence a kvality oocytu také stav chromatinu a transkripční aktivita. Jádro je v tuto chvíli ve stadiu zvaném GV (Germinal Vesicle, zárodečný váček). Podle klasické klasifikace je chromatin v jádře meioticky kompetentního oocytu v konfiguraci GV1, kdy je patrné jádérko a okolo něj strukturovaný kroužek chromatinu. Takový oocyt je transkripčně neaktivní a je připraven k zahájení meiózy na rozdíl od oocytu s rozptýleným chromatinem v konfiguraci GV0 (Motlík & Fulka, 1976; Sun et al., 2004). V literatuře se v souvislosti s prasečími oocyty objevují také označení SN (Surrounded Nucleolus) pro oocyt s kompaktním transkripčně neaktivním chromatinem a NSN (Non-Surrounded Nucleolus) pro difúzní a transkripčně aktivní chromatin (Lee et al., 2019; Pan et al., 2018).

1.3.2. Meiotické zrání

Ke konci růstové fáze získávají oocyty meiotickou kompetenci a mohou projít poslední fází svého vývoje – meiotickým zráním, které dá vznik oocytu připravenému k oplození. Meiotické zrání zahrnuje výstup z I. meiotického bloku v diplotene profáze I. Následuje dokončení prvního meiotického dělení a vyloučení prvního pólového tělíska s polovinou chromozomů do perivitelinního prostoru oocytu. Poté oocyt vstupuje do druhého meiotického dělení, které je zastaveno v metafázi II. V II. meiotickém bloku setrvává oocyt až do oplození spermií, kdy je meióza dokončena a dochází k vyloučení druhého pólového tělíska.

Meiotické zrání je v oocytu zastaveno díky vysoké hladině cAMP, který je produkován adenylát cyklázou (Bornslaeger et al., 1986; Hinckley et al., 2005). cAMP podporuje aktivitu proteinkinázy A (PKA), která stimuluje aktivitu Wee1 kinázy, která je inhibitorem cyklin dependentní kinázy 1 (CDK1) (Bornslaeger et al., 1986; Han et al., 2005). PKA také inhibuje aktivační fosfatázu CDC25, která aktivuje funkci CDK1 (Pirino et al., 2009). Oocyt je schopen cAMP hydrolyzovat díky činnosti fosfodiesterázy 3A (PDE3A), jejímž primárním substrátem je ale cGMP (Masciarelli et al., 2004). cGMP je syntetizován guanylyl cyklázou v granulózních buňkách a transportován do oocytu. Díky tomuto mechanismu je udržena vysoká hladina cAMP, nedochází k aktivaci CDK1 a oocyt zůstává v I. meiotickém bloku (Norris et al., 2009). Fáze zrání je *in vivo* zahájena v období pohlavní dospělosti díky vlně luteinizačního hormonu (LH) v období ovulace (Channing et al., 1978). LH způsobí pokles hladiny cGMP v oocytu a díky tomu PDE3A začíná hydrolyzovat cAMP (Conti et al., 1998; Masciarelli et al., 2004; Norris et al., 2009). Po snížení dosud stabilní hladiny cAMP dochází k inhibici Wee1 kinázy a aktivaci CDC25 fosfatázy. Díky tomu dojde k aktivaci CDK1 kinázy v komplexu s cyklinem B1 (Han et al., 2005; Zhang et al., 2008). Jedním z hlavních substrátů

CDK1 s cyklinem B1 je lamin A/C, po jehož fosforylaci dochází k rozpadu jaderné membrány a zahájení meiotického zrání (Adhikari et al., 2012). *In vitro* dochází ke znovuzahájení meiózy při odstranění oocyty z antrálního folikulu (Wassarman et al., 1976).

Aktivitu CDK1 v savčích oocytech kromě hladiny cAMP ovlivňuje její substrát cyklin B1. Správná regulace hladiny cyklinu B1 je klíčová pro načasování výstupu z meiotického bloku, GVBD a následnou progresi I. meiotickým dělením (Marangos & Carroll, 2004; Polanski et al., 1998). Důležitým faktorem je také prostorová lokalizace komplexu CDK-cyklin B1. V oocyty v GV stadiu před zahájením meiózy je CDK1 s cyklinem B1 lokalizována v cytoplasmě. Na základě změn, které vedou ke GVBD, dochází k transportu komplexu CDK1-cyklin B1 do jádra, kde později probíhá fosforylace laminu A/C a dalších proteinů (Adhikari et al., 2012; Marangos & Carroll, 2004).

Po fosforylaci laminů A/C dochází k postupnému rozpadu jaderné membrány. Mikroskopicky je možné během GVBD pozorovat 4 stadia jádra označovaného jako GV (Germinal Vesicle, zárodečný váček) a to GV1 – GV4. GV1 je počáteční stadium dosud intaktního jádra. Chromatin se nachází okolo dobře viditelného jadérka, okolo nějž tvoří kroužek nebo strukturu podkovy. GV2 je fází, kdy dochází k počátku GVBD a chromatin okolo jadérka se pomalu začíná shlukovat na jaderné membráně. V GV3 začíná chromatin tvořit větší shluky rozmístěné okolo jadérka a na periferii jaderné membrány, která je stále intaktní. GV4 stadium je charakterizované vymizením jádra a filamentárním uspořádáním chromatinu (Motlík & Fulka, 1976). Kromě rozpadu jaderné membrány dochází také ke kondenzaci chromozomů na základě modifikací histonů způsobených rovněž aktivací CDK1 s cyklinem B1 (Adhikari et al., 2012; Enserink & Kolodner, 2010).

Ke ztrátě centriol v oocyty dochází již během profáze I, a proto v oocyty musí být zajištěna organizace dělicího vřeténka pomocí jiných MTOC, než jsou centrozomy. Obecně u savců zajišťují funkci MTOC různé skupiny a komplexy proteinů pericentriolární matrix, které narozdíl od samotných centriol nebyly degradovány (Bennabi et al., 2016; Szollosi et al., 1972). Díky nepřítomnosti centriol je meiotické vřeténko soudkovité s výrazně méně zaostřenými póly, než má vřeténko mitotické (Merdes & Cleveland, 1997). Vznik bipolárního meiotického vřeténka začíná *de novo* vznikem samostatně se organizujících MTOC v období před zahájením meiotického zrání. Jednotlivá MTOC během své organizace reagují spolu navzájem a poté s jadernou obálkou (Schuh & Ellenberg, 2007). Ještě před rozpadem jaderné obálky začíná proces fragmentace MTOC, pro který je klíčová fosforylace polokinázou 1 (Plk1) a funkce molekulárních motorů, zejména dyneinu zakotveného do jaderné membrány. Později po znovuzahájení meiózy a rozpadu jaderné obálky přispívají k fragmentaci také

některé kineziny, např. KIF11 (Clift & Schuh, 2015). Díky fragmentaci probíhá reorganizace MTOC a dochází tak k počátku nukleace mikrotubulů z MTOC. Tvorba meiotického vřeténka je velmi dynamický proces. Nejdříve dochází k seskupení MTOC do několika oblastí a tvorbě multipolárního vřeténka. V případě správné funkce se postupně tvoří dva póly MTOC a z nich probíhá dynamická nukleace mikrotubulů bipolárního dělicího vřeténka (Clift & Schuh, 2015; Li & Albertini, 2013; Schuh & Ellenberg, 2007).

MTOC obsahují množství proteinů nezbytných pro udržení jejich funkce a struktury během tvorby meiotického vřeténka. Nezbytnou součástí jsou γ -tubulinové ring komplexy (γ TuRC), které jsou přítomny i v acentriolárním dělicím vřeténku a zajišťují samotnou nukleaci mikrotubulů (Gueth-Hallonet et al., 1993). Dále jsou přítomny proteiny, které podporují stabilitu γ TuRC a vznikajících mikrotubulů nebo obecně samotných MTOC. Mezi ty patří například pericentrin, NEDD1, NuMA, Cep152, Cep192, Plk1, polokináza 4 (Plk4) a mnoho dalších (Carabatsos, Combelles, et al., 2000; Lee et al., 2018; Lee et al., 2000; Ma et al., 2010).

U savců kromě MTOC přispívá k tvorbě meiotického vřetene také Ran-GTP dráha. Tato dráha je využívána k transportu proteinů mezi cytoplasmou a jádrem u oocytů ale i somatických buněk. Náklad určený k transportu do jádra je vázán na proteiny importiny β v cytoplasmě, kde je vysoká hladina Ran-GDP. Importiny β poté procházejí i s nákladem přes jaderné póry. Uvnitř jádra je vysoká hladina Ran-GTP a při takových podmínkách dochází k oslabení vazby importinu a jeho nákladu (Clarke & Zhang, 2008). I po rozpadu jaderné membrány je v jádře vysoká koncentrace Ran-GTP. Importiny β tedy mohou vázat různé spindle assembly faktory jako svůj náklad a dopravovat je do blízkosti chromozomů, kde je vysoká hladina Ran-GTP. Takto transportované spindle assembly faktory pak přispívají k tvorbě meiotického vřeténka. (Drutovic et al., 2020; He et al., 2022). Pro tvorbu bipolárního meiotického vřeténka je u prasečích oocytů nezbytná funkce a kooperace obou výše popsaných drah (Kim et al., 2019).

K tvorbě meiotického vřeténka v oocytech také významně přispívá mikrofilamentární cytoskeletární systém. Funkce aktinového cytoskeletu je klíčová především pro zajištění asymetrického dělení oocytu v prvním i druhém meiotickém dělení. Aktin a s ním asociované proteiny pomáhají orientaci meiotického vřeténka tak, aby mohlo být vyloučeno pólóvé tělísko obsahující polovinu chromozomů, ale minimální objem cytoplazmy (Schuh & Ellenberg, 2008; Zhu et al., 2003). K organizaci aktinových filament v rámci dělicího vřeténka významně přispívají aktin nukleující faktory, kterými jsou například forminy nebo Arp2/3 komplex (Yi et al., 2013).

Během I. meiotického dělení dochází k párování homologních chromozomů a jejich následné segregaci. Dělení je výrazně asymetrické a jeho výsledkem je oocyt s poloviční sadou chromozomů. Druhá sada chromozomů je vyloučena v podobě pólového tělíska (Holt et al., 2013). Chromozomová struktura bivalentu je v metafázi I zajištěna pomocí meiotického kohezinu a bivalent je napojen na mikrotubuly dělicího vřeténka pomocí kinetochoru v oblasti centromery (Watanabe, 2012; Watanabe & Nurse, 1999). Kinetochor také obsahuje skupinu proteinů Spindle Assembly Checkpointu (SAC), které zabraňují předčasné segregaci chromozomů při chybném napojení na meiotické vřeténko nebo poškození DNA (Collins et al., 2015). Při správném napojení všech bivalentů je umožněn přechod do anafáze I díky aktivaci ubiquitin ligázy Anaphase Promoting Complex (APC). APC degraduje protein securin, který dosud udržoval separázu v inaktivním stavu. Substrátem separázy jsou koheziny a po její aktivaci tedy dochází k segregaci homologních chromozomů (Jones, 2011). Sesterské chromatidy jsou v meióze I před štěpením separázou chráněny pomocí shugoshinu (Lee et al., 2008). Dalším substrátem APC je také cyklin B1 a díky jeho degradaci dochází k poklesu CDK1 aktivity a dokončení I. meiotického dělení (Jones, 2011).

Po dokončení I. meiotického dělení nevstupuje oocyt do interfáze, ale rovnou do II. meiotického dělení. Následně dochází k II. meiotickému bloku v metafázi druhého meiotického dělení. Udržení oocyty v meiotickém bloku je zajištěno inhibicí APC a stabilizací CDK1- cyklin B1 pomocí cytostatického faktoru (CSF) (Kubiak et al., 1993). CSF zahrnuje efekторы Mos/MAPK signální dráhy a jeho esenciální součástí je také faktor Emi2, který je zapojen do znovuzahájení meiózy po oplození (Shoji et al., 2006).

Neméně důležitou součástí meiotické maturace jsou kromě jaderného zrání také změny v cytoplasmě, které započaly již během růstové fáze. Golgiho aparát dále fragmentuje na malé váčky rozprostřené po cytoplasmě oocyty. Během GVBD přispívá k fragmentaci fosforylace pomocí CDK1 (Racedo et al., 2012). Kortikální granula během cytoplasmatického zrání migrují k periférii cytoplasmy pod plasmatickou membránu za pomoci aktinového cytoskeletu (Connors et al., 1998). Po oplození dochází k exocytóze kortikálních granul, modifikaci ZP a zabránění polyspermii (Bleil et al., 1981).

Endoplasmatické retikulum (ER) prodělává strukturální změny a je redistribuováno v cytoplasmě. V GV stadiu tvoří ER síť rovnoměrně distribuované po oocyty. Později během progresu meiotickým zráním dochází k tvorbě ER clusterů, které jsou v MII lokalizovány mimo oblast dělicího vřeténka (FitzHarris et al., 2007). ER je v oocyty důležitou zásobárnou Ca^{2+} iontů a je tak velmi důležitou organelou pro intracelulární signalizaci. Ca^{2+} signalizace je

pro oocyt klíčová zejména během oplození, kdy dochází k oscilaci Ca^{2+} iontů v oocytu pro dokončení II. meiotického dělení (Saunders et al., 2002).

Mitochondrie jako zdroj ATP jsou velmi důležitou organelou pro správný průběh meiotického zrání, které je velmi energeticky náročným procesem (Ge et al., 2012; Stojkovic et al., 2001). Během progresu oocytu obdobím meiotické maturace dochází k patrné redistribuci mitochondrií a nabohacení právě v oblastech s vyšší energetickou potřebou (Yu et al., 2010). U prasečích oocytů jsou mitochondrie redistribuovány zejména díky dynamice mikrotubulů. Před výstupem z I. meiotického bloku jsou mitochondrie seskupeny okolo jádra. Po GVBD je nejvýraznější akumulace mitochondrií pozorována v perinukleární oblasti a je také patrná tvorba malých shluků mitochondrií (Sun et al., 2001; Yu et al., 2010). Při tvorbě meiotického vřeténka část mitochondrií asociuje s MTOC a účastní se tak asymetrického dělení. Do pólového tělíska jsou pak transportovány méně kvalitní mitochondrie pro jejich eliminaci a výběr nejkvalitnějších mitochondrií pro budoucí embryo (Dalton & Carroll, 2013). Kromě redistribuce dochází také k navýšení počtu mitochondrií a počtu kopií mtDNA. Prasečí oocyty s vyšším počtem kopií mtDNA mají obecně vyšší šanci na oplození a vyšší podíl úspěšného vývoje raných embryí (Lee et al., 2014; Mao et al., 2012). Počet kopií a kvalita mtDNA je asociována také se stářím oocytu. Stejně jako jaderná DNA může být mtDNA mutována a tyto mutace přispívají k poruchám metabolismu nebo ztrátě mitochondrií. Při snížení počtu kopií mtDNA je pak výrazně snížena úspěšnost vývoje embrya a vyšší šance přenosu mutace do dalších generací (Cree et al., 2008; Schon et al., 2000).

1.4. Folikulogeneze

Proces tvorby folikulu je úzce spjatý s růstem a vývojem oocytu díky vzájemné intenzivní komunikaci mezi oocytem a somatickými buňkami folikulu (Ackert et al., 2001; Eppig, 2001). Po rozpadu germ cell nests vznikají v oblasti budoucích ovarii primární oocyty meioticky zastavené v profázi I obklopené primordiálním folikulem. Primordiální folikul je charakteristický jednou vrstvou plochých pre-granulózniích buněk (Eppig, 2001). K vývoji primordiálních folikulů přispívá několik faktorů, mezi které patří například pro folikulogenezi specifický faktor FIGLA, FOXL2 nebo faktory KIT signální dráhy (Jones & Pepling, 2013; Soyol et al., 2000; Uda et al., 2004). Z plochých pre-granulózniích buněk se později stávají kubické buňky granulóznií. Oocyt je stále obklopen jednou vrstvou těchto somatických buněk a folikul je nazýván primární. Poté dochází k proliferaci a růstu granulózniích buněk i samotného oocytu a vzniká sekundární folikul, který obsahuje primární oocyt obklopený několika vrstvami granulózniích buněk (Da Silva-Buttkus et al., 2008; Eppig, 2001).

Kolem vnější vrstvy granulózních buněk se začíná tvořit bazální lamina, díky které začínají granulózní buňky diferencovat a tvoří se *Theca folliculi*. Tato vrstva buněk se následně diferencuje na vnitřní *Theca interna* a vnější *Theca externa*. *Theca interna* představuje kompaktní vrstvu vysoce vaskularizovaných buněk se steroidogenní aktivitou, které v odpovědi na LH syntetizují androgeny. *Theca externa* není steroidogenně aktivní a skládá se z vrstvy méně kompaktních buněk (Magoffin, 2005). Na komunikaci mezi oocytem a granulózními buňkami se v této fázi vývoje folikulu významně podílí signální dráhy zahrnující faktory z rodiny TGF- β (Trombly et al., 2009). Oocyt produkuje BMP15 a GDF9. Tyto růstové faktory spouští zpětnovazebnou signalizaci pro proliferaci a růst granulózních buněk a podporují diferenciaci *Theca folliculi* (Alam & Miyano, 2020; Liu et al., 2015; Yan et al., 2001). Granulózní buňky produkují TGF- β a aktivin (Alam & Miyano, 2020). Buňky *Theca folliculi* secernují BMP4 a BMP7 (Erickson & Shimasaki, 2003). Důležitou součástí mezibuněčné komunikace je přítomnost gap junctions, které zajišťují přímou komunikaci mezi oocytem a buňkami granulózy a mezi buňkami granulózy vzájemně (Ackert et al., 2001; Carabatsos, et al., 2000). Pro strukturu gap junctions jsou klíčové konexiny Cx37 a Cx43 (Teilmann, 2005).

Dalším krokem vývoje folikulu je tvorba dutinek naplněných folikulární tekutinou mezi granulózními buňkami. Dutinky se postupně zvětšují a pak se spojí do jedné velké zvané *antrum* (Rodgers et al., 2001). V tuto chvíli je vytvořen antrální folikul, kde opět dochází k další diferenciaci populací granulózních buněk. Vrstva po obvodu stěn folikulu je označována jako murální granulóza a vrstvu obklopující oocyt tvoří kumulární buňky neboli *Cumulus oophorus* (Diaz et al., 2007). Buňky murální granulózy jsou důležité pro steroidogenezi, zatímco kumulární buňky podporují růst a vývoj oocyty (Edson et al., 2009). Vznik antrálního folikulu je na rozdíl od předchozích fází folikulogeneze závislý na folikulostimulačním hormonu (FSH) (Kumar et al., 1997). Pod vlivem FSH dochází v granulózních buňkách ke konverzi androgenů syntetizovaných *Theca interna* na estrogény, které dále podporují vývoj folikulu (Magoffin, 2005). FSH také chrání granulózní buňky před apoptózou a podporuje jejich proliferaci a podporuje expresi receptoru pro LH (Erickson et al., 1979; Chun et al., 1996; Maruo et al., 1999).

Poslední fází folikulogeneze je vývoj preovulačního Graafova folikulu. Na základě vlny LH dochází k prasknutí stěny folikulu a ovulaci oocyty. Současně v oocyty probíhá výstup z I. meiotického bloku a dokončení meiotického zrání (Sun et al., 2009; Tsafiri & Reich, 2009). Ovulovaný oocyt obklopený kumulárními buňkami je v tuto chvíli označován jako cumulus-oocyte complex (COC). Spojení mezi kumulárními buňkami se postupně rozvolňují

a dochází k expanzi COC díky syntéze kyseliny hyaluronové (Chen et al., 1990). Buňky *Theca folliculi* a murální granulózy v prázdném folikulu prochází rediferenciací a později tvoří žluté tělísko *Corpus luteum*, které je zdrojem progesteronu (Reynolds & Redmer, 1999).

2. Vybrané faktory a markery regulace meiotického zrání

2.1. Maturation promoting factor MPF

MPF je obecné označení pro CDK1 a její substrát cyklin B1, tedy molekuly, které jsou hlavními efekty výstupu oocyty z I. meiotického bloku. Po preovulační vlně LH dochází v oocyty k poklesu hladiny cAMP a díky tomu aktivaci CDK1 (Adhikari & Liu, 2014). Během I. meiotického bloku je CDK1 inhibována kinázou Wee1, která fosforyluje CDK1 na Thr14 a Tyr15 (Han et al., 2005). Regulace CDK1 se účastní také fosfatáza CDC25, která naopak defosforyluje Thr14 a Tyr15, a tím podporuje aktivaci MPF (Lincoln et al., 2002). CDK1 fosforyluje množství substrátů, mezi které patří také proteinfosfatázy defosforylující substráty CDK1. Během GVBD CDK1 fosforyluje, a tím inaktivuje proteinfosfatázu 1 (PP1). CDK1 dále fosforyluje greatwall kinázu, která inaktivuje další z fosfatáz PP2A. Inaktivace fosfatáz PP1 a PP2A umožňuje masivní fosforylaci CDK1 substrátů a další progres I. meiotickým dělením (Adhikari et al., 2012; Burgess et al., 2010; Gharbi-Ayachi et al., 2010).

Pro vstup do anafáze je nutný pokles aktivity MPF, což umožní rozchod homologních chromozomů (Hashimoto & Kishimoto, 1988). Následně probíhá znovu nárůst MPF pro navazující vstup do meiózy II bez interfáze. Komplex CDK1-cyklin B1 je udržován aktivní díky CSF během metafáze II a vysoká aktivita MPF je dále potřebná pro udržení II. meiotického bloku. Po oplození je MPF degradován pro vstup do anafáze II a dokončení II. meiotického dělení (Madgwick & Jones, 2007; Oh et al., 2013).

2.2. Cytostatic factor CSF

CSF je komplex proteinů, který zajišťuje regulaci MPF během meiotické maturace oocyty. CSF udržuje vysokou aktivitu MPF v metafázi I díky inhibici APC komplexu. V anafázi I aktivita MPF klesá, ale znovu narůstá po vstupu do II. meiotického dělení a je udržována během II. meiotického bloku až do aktivace oocyty spermií v případě oplození (Madgwick & Jones, 2007; Masui, 1991).

CSF není jednou konkrétní molekulou ale spíše komplexem proteinů, které spolu vzájemně interagují. Tyto proteiny mají v různých fázích meiotické maturace různě důležitou úlohu, což umožňuje dynamickou regulaci aktivity MPF (Schmidt et al., 2006). První objevenou součástí CSF je protein Mos, produkt protoonkogenu c-mos. Mos je kináza specifická pro zárodečné buňky a je katalytickou podjednotkou zajišťující stabilizaci MPF

(Sagata et al., 1989; Watanabe et al., 1989). Kináza Mos spouští signální dráhu, která zahrnuje mitogen-aktivovanou proteinkinázu (MAPK), kinázu Rsk a podjednotky SAC, proteiny Mad1, Mad2 a Bub1 (Bhatt & Ferrell, 1999; Haccard et al., 1993; Tunquist et al., 2002, 2003). Pro udržení oocyty v II. meiotickém bloku je klíčovou součástí CSF protein Emi2. Tento protein zabráňuje degradaci CSF v průběhu metafáze II. Následně po oplození je Emi2 pro vstup do anafáze II degradován Plk1 v odpovědi na Ca²⁺ signalizaci (Shoji et al., 2006; Tung et al., 2005).

2.3. MAPK

Dalším faktorem klíčovým pro průběh meiotického zrání je rodina Ser/Thr kináz MAPK, které zprostředkovávají přenos signálu z povrchu buňky do jádra. V savčích oocytech jsou hojně exprimovány kinázy ERK1 a ERK2 účastníci se meiózy. Aktivita MAPK signální dráhy je vedle MPF důležitá pro výstup z I. meiotického bloku indukovaného vlnou LH (Fan & Sun, 2004; Sun et al., 1999). U různých savců je různě důležitá funkce MAPK v zahájení meiózy a také dochází k různému načasování fosforylace. U většiny savců zřejmě MAPK dráha není potřebná pro samotný proces GVBD, ale její aktivita se objevuje později při výstupu z I. meiotického bloku. U myši byla pozorována aktivita MAPK nejdříve 2 hodiny po GVBD. U skotu se aktivace MAPK objevuje simultánně s GVBD. U prasat je v období GVBD detekovatelná pouze nízká aktivita MAPK a výrazný nárůst je pozorován až v metafázi I. Podobné charakteristiky aktivace MAPK jako u prasete byly popsány i u člověka (Fan & Sun, 2004; Fissore et al., 1996; Verlhac et al., 1993; Zhang et al., 2011). U prasat stejně jako u dalších savců hraje MAPK dráha roli v regulaci MPF také v II. meiotickém bloku. Kinázy ERK1/2 jsou fosforylovány a aktivovány kinázou MEK. Substrátem kináz ERK1/2 je kináza Rsk, která je součástí CSF a reguluje aktivitu CDK1 (Li, 2002; Ohashi et al., 2003) MAPK signální dráha je také esenciální pro organizaci mikrotubulů a výstavbu a normální morfologii dělicího vřeténka. V metafázi I i metafázi II asociují proteiny MAPK signální dráhy s póly dělicího vřeténka (Gordo et al., 2001; Verlhac et al., 1996).

2.4. Pohlavní hormony

Hormony HPG osy (Hypothalamic-pituitary-gonadal axis, osa Hypothalamus-hypofýza-gonády) centrálně řídí reprodukční funkce organismu. Počátkem hormonální kaskády HPG osy je hypothalamus, který v pulzech produkuje Gonadotropin-releasing hormon (GnRH,

gonadotropiny uvolňující hormon). GnRH stimuluje adenohipofýzu k produkci gonadotropinů FSH a LH do krve. Gonadotropiny jsou dále transportovány krví a stimulují tvorbu steroidních hormonů estrogenu, progesteronu a testosteronu a gametogenezi ve vaječnicích a varlatech (Dwyer & Quinton, 2019; Christensen et al., 2012).

Steroidní hormony jsou lipidické molekuly syntetizované ze společného prekurzoru, kterým je cholesterol (Miller, 1988). Tyto hormony poté vstupují do krve a jsou roznášeny po těle, kde mohou ovlivňovat všechny buňky, které pro ně mají receptory. Receptory steroidních hormonů jsou převážně cytosolické nebo jaderné, protože díky své lipofilní povaze mohou steroidní hormony procházet přes plasmatickou membránu (Baumann et al., 1999). Po vazbě hormonu na receptor působí tento komplex v jádře jako transkripční faktor a má tak na buňku genomický efekt. Specifita odpovědi buňky na steroidní hormony tak může být regulována na úrovni receptoru, ale také na úrovni chromatinu (Beato et al., 1996; Kinyamu & Archer, 2004). Steroidní hormony se mohou vázat i na receptory na plasmatické membráně a pak působí na buňku negenomickým efektem na úrovni aktivace signálních drah spjatých s tímto receptorem (Pietras et al., 2001).

Dominantním hormonem ze skupiny estrogenů je estradiol. Estradiol je převážně syntetizován ve vaječnicích buňkami granulózy. Nejprve dochází k syntéze androgenů v buňkách *Theca folliculi*, odkud androgeny přechází do okolní granulózy (Evans et al., 1981; Magoffin, 2005). Tady jsou za pomoci enzymů aromatáza a 17β hydroxysteroid dehydrogenáza a pod vlivem FSH přeměněny na estradiol (Xiao et al., 2023). Estradiol ovlivňuje růst folikulu a zajišťuje zpětnovazebnou regulaci GnRH, FSH a LH, a tím regulaci ovariálního cyklu (Radovick et al., 2012). Estradiol se v buňce váže na estrogenové receptory ER α a ER β . Po vazbě estradiolu na receptor je vytvořený komplex ER-estradiol lokalizován do jádra, kde se na DNA váže na estrogen responzivní elementy (ERE), a funguje jako transkripční faktor (Mosselman et al., 1996; Yaşar et al., 2017). Komplex ER-estradiol může působit na DNA také nepřímo ovlivněním vzájemných interakcí dalších transkripčních faktorů a responzivních elementů (Marino et al., 2006). Kromě jaderných receptorů ER α a ER β má estradiol také membránový receptor GPER1 (G-protein coupled estrogen receptor, s G proteinem spjatý estrogenový receptor) (Filardo et al., 2007; Prossnitz & Barton, 2011). GPER1 má oproti jaderným receptorům nízkou afinitu k estradiolu, ale může se účastnit odpovědi na tento hormon pomocí aktivace intracelulárních signálních kaskád (Filardo & Thomas, 2005; Prossnitz & Barton, 2011).

Progesteron je dominantním hormonem ze skupiny gestagenů. Progesteron je po ovulaci produkován žlutým tělískem vytvořeným z ovulovaného folikulu (Khan-Dawood et al., 1989).

V rámci ovariálního cyklu podporuje progesteron tvorbu výstelky děložní sliznice pro případnou implantaci embrya. Pokud nedojde k oplození, žluté tělísko zaniká a hladina progesteronu klesá (Davis & LaVoie, 2019). Progesteron se v buňce váže na intracelulární progesteronový receptor (PR). Po vazbě progesteronu dojde k tvorbě komplexu PR-progesteron, který se váže na DNA na specifické progesteron responzivní elementy (PRE). Tento komplex funguje jako transkripční faktor a reguluje transkripci cílových genů (Grimm et al., 2016).

2.5. H3K4me2

Během vývoje a meiotické maturace oocyty probíhají výrazné změny také na epigenetické úrovni. Jedním z klíčových epigenetických mechanismů je pro oocyt methylace histonů. Procesy methylace a demethylace histonů se významně podílí na regulaci genové exprese a úspěšném vývoji oocytů a raných embryí (Gu et al., 2010; He et al., 2021). Během vývoje oocyty hraje methylace a demethylace histonů, zejména histonu H3, klíčovou roli v regulaci transkripce a organizace chromatinu (Sha et al., 2020). Po oplození je časný vývoj embrya ovlivněn epigenetickými modifikacemi maternálního a paternálního genomu. Během dalšího vývoje embrya, kdy dochází k aktivaci embryonálního genomu, je důležité načasování a míra methylace a demethylace histonů a správná regulace potřebných enzymů (Aoshima et al., 2015; Glanzner et al., 2017; Hontelez et al., 2015). Methylace histonových zbytků je zajištěna enzymem obecně zvaným histon lysin methyltransferáza (KMT) a to přesunem methylových zbytků z S-adenosyl methioninu. Methylace je reverzibilní proces a odstranění methylové skupiny může být zajištěno histon lysin demethylázou (KDM) (Black et al., 2012). Histonové methylace H3K4 – H3K4me1, H3K4me2 a H3K4me3 jsou u oocytů evolučně konzervované a vyskytují se v promotorech i uvnitř aktivně transkribovaných genů (Barski et al., 2007; Bilmez et al., 2022). Podle recentní studie Mei et al., 2023 narušení rovnováhy v methylaci H3K4 vede kromě narušení transkripce také k disrupci metabolismu mitochondrií a snížení množství kopií mtDNA, což vede ke snížené kvalitě oocytů.

2.6. 5-methylcytosin

Dalším epigenetickým mechanismem v savcích oocytech je methylace DNA. Velmi obvyklou modifikací je přidání methylové skupiny na 5. uhlík báze cytosinu, čímž vzniká 5-methylcytosin (5mC) (Sendžikaitė & Kelsey, 2019). U savců se 5mC vyskytuje převážně v oblastech CpG ostrůvků, kde jsou symetricky methylovány cytosiny v obou vláknech DNA. V oocytech se ale oproti jiným buňkám často vyskytuje i asymetrická methylace jednoho

vlákna mimo CpG oblasti (Shirane et al., 2013; Tomizawa et al., 2011). Enzymy zajišťující metylaci se obecně nazývají DNA methyltransferázy a donorem methylové skupiny je S-adenosyl methionin. V oocytech dominují methyltransferázy DNMT1, DNMT3A a DNMT3B, které jsou exprimovány v různých časových obdobích vývoje oocyty a zajišťují specifický methylační vzorec DNA (Uysal et al., 2015; Uysal & Ozturk, 2017). DNA methylace má přímý vliv na expresi genů v oocyty a díky přenosu methylačního vzorce při replikaci má oocytární methylace DNA vliv na methylační vzorec budoucího embrya (Tomizawa et al., 2012). Methylace CpG ostrůvků je také součástí imprintingu, kdy je jedna alela genu methylována specificky u oocyty nebo spermie. Methylační značky imprintingu jsou po oplození přeneseny do embrya a hrají důležitou roli v jeho dalším vývoji (Kobayashi et al., 2012).

2.7. Sirtuin 3

Sirtuiny jsou třídou NAD⁺ dependentních histondeacetyláz. Tyto enzymy zajišťují v buňce deacetylaci histonů, ale také dalších strukturálních proteinů a metabolických enzymů, a tím ovlivňují jejich funkci a aktivitu. Při deacetylaci je acetylová skupina odstraněna z proteinu a přesunuta na NAD⁺. Díky tomu je aktivita sirtuinů závislá na poměru NAD⁺/NADH a tyto histondeacetylázy tak fungují jako ukazatelé energetické aktivity v buňce (Houtkooper et al., 2012; Sauve et al., 2006). U savců je známo celkem sedm sirtuinů, které se odlišují svojí lokalizací v buňce. Sirtuiny 1 a 2 se vyskytují v jádře a cytosolu, sirtuiny 3, 4 a 5 jsou mitochondriálně specifické a sirtuiny 6 a 7 se vyskytují pouze v jádře (Michan & Sinclair, 2007).

Sirtuin 3 (SIRT3) je lokalizován v mitochondriích savčích oocytů a v buňkách vyvíjejícího se folikulu. Během meiotické maturace hladina SIRT3 narůstá až do oplození a tvorby prvojader. To poukazuje na důležitou roli této mitochondriální histondeacetylázy pro meiotickou maturaci (Fu et al., 2014; Zhao et al., 2016). Při narušení exprese SIRT3 sice zřejmě nedochází k přímému narušení jaderného zrání, ale dochází k oxidativnímu poškození mitochondrií, což má negativní vliv na metabolismus oocyty a časného embrya (Iljas & Homer, 2020; Kawamura et al., 2010). SIRT3 je jedním z klíčových regulátorů metabolismu savčích mitochondrií. V souvislosti s mitochondriemi v oocyty a buňkách folikulu je důležitou rolí SIRT3 regulace oxidativní fosforylace a produkce ATP stejně jako regulace ROS pomocí aktivace enzymu superoxididismutáza. Při dysregulaci SIRT3 tak dochází k narušení oxidativní fosforylace a tvorby ATP a k nadměrné produkci ROS, což má za

následek oxidativní poškození mitochondrií (Kawamura et al., 2010; Qi et al., 2024; Rardin et al., 2013).

2.8. TOMM20

TOMM20 (Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20, translokáza vnější mitochondriální membrány 20) je receptorovou součástí translokázového komplexu TOM ve vnější membráně mitochondrií, který zajišťuje transport proteinů z cytosolu (Bhagawati et al., 2021). TOMM20 se ve studiích běžně používá jako marker množství mitochondrií v buňce a pokles jeho exprese většinou poukazuje na degradaci mitochondrií a mitofagii (Itami et al., 2018; Ito et al., 2020; Shen et al., 2021).

2.9. Acetyl- α -tubulin

Acetylace α -tubulinu na lysinu 40 je jednou z nejobvyklejších posttranslačních modifikací mikrotubulů. Acetylace je zprostředkována enzymem α -tubulin acetyltransferáza a deacetylace probíhá díky histondeacetylázám (Li & Yang, 2015). Acetylace na lysinu 40 se zpravidla vyskytuje na stabilních mikrotubulech. Důvodem je strukturální změna, kterou způsobuje přidání acetylové skupiny v α -tubulinu. To pak ovlivňuje stabilitu výsledného mikrotubulu a zajišťuje jeho větší mechanickou odolnost (Portran et al., 2017; Xu et al., 2017). V meiotickém vřeténku je acetylace na lysinu 40 asociována se stabilizací mikrotubulů v metafázní rovině pro pevný kontakt s kinetochorem a správné uspořádání chromozomů. Určitá hladina acetylace je zřejmě potřebná také pro primární sestavení vřeténka. Naopak příliš vysoká acetylace lysinu 40 na α -tubulinu narušuje dynamiku mikrotubulů a správnou funkci meiotického vřeténka (Li et al., 2017; Serra et al., 2018).

3. Reprodukčně toxické látky

Za reprodukčně toxické látky jsou považovány sloučeniny, které vstupují do organismu živočichů a narušují zde jeho reprodukční funkce. Tyto látky jsou většinou syntetické sloučeniny vyrobené člověkem, které se vyskytují v předmětech denní potřeby, a odsud vstupují do životního prostředí. Zde se mohou kumulovat a živočichové včetně člověka jsou jim tak nepřetržitě vystavováni (Younglai et al., 2007). Reprodukčně toxické látky negativně ovlivňují reprodukční zdraví samců i samic savců a člověka. U samců může v závislosti na koncentraci látky docházet k různě rozsáhlým poškozením reprodukčního traktu a například zhoršení parametrů kvality ejakulátu (Krzastek et al., 2020). U samic vede vystavení reprodukčně toxickým látkám k poškození ovariálních zásob, narušení hormonálního cyklu a poškození reprodukčních orgánů (Bhardwaj, 2014). To může vést až k hormonálním onemocněním jako je například syndrom polycystických ovarií (PCOS) (Rutkowska & Diamanti-Kandarakis, 2016). U samic reprodukčně toxické látky kromě narušení funkce samotných reprodukčních orgánů negativně ovlivňují také vývoj plodu a mohou mít vliv na jeho pozdější zdraví a reprodukci (Di Renzo et al., 2015). Mezi známé reprodukčně toxické látky patří pesticidy, těžké kovy, organická rozpouštědla, složky plastů, alkohol a drogy.

3.1. Endokrinní disruptory

Množství reprodukčně toxických látek je v současnosti považováno za endokrinní disruptory. Endokrinní disruptor (ED) je definován jako „*exogenní látka nebo směs látek, která mění funkce endokrinního systému a způsobuje nepříznivé účinky na zdraví organismu nebo jeho potomků nebo subpopulací*“ (World Health Organization, 2002).

Součástí endokrinního systému organismů jsou endokrinní orgány a hormony produkované těmito orgány. Hormony jsou distribuovány po těle a účinkují ve tkáních se specifickými receptory. Hormony tak s buňkou neinteragují přímo, ale nepřímým způsobem vazby ligandu na receptor. Specifikem hormonů je také schopnost účinku ve velmi nízkých koncentracích, většinou v řádech pikomolů. To je umožněno jednak díky vysoké afinitě receptorů a jejich schopnosti vázat více molekul hormonu. Dalším důvodem je nelineární vztah mezi koncentrací hormonu, počtem obsazených receptorů a hladinou odpovědi na koncentraci hormonu. I malé změny v koncentraci hormonů tedy mohou vyvolat významné změny v endokrinním systému. Tyto vlastnosti hormonů souvisí s jedním z fenoménů v rámci mechanismu působení ED, kterým je efekt nízké dávky. ED stejně jako hormony jsou schopny vyvolávat odpověď organismu při nízkých koncentracích, a naopak vyšší

koncentrace ED nevyvolává silnější odpověď. Závislosti je tak nelineární a je možné pozorovat takzvanou nemonotónní odezvu. To znamená, že křivka závislosti koncentrace látky na odpovědi organismu není monotónní, většinou vykazuje tvar písmene U nebo inverzní. (Vandenberg et al., 2012; Welshons et al., 2003).

Existuje několik potvrzených způsobů, kterými ED interferují s endokrinním systémem. Jedním z mechanismů účinku je vazba ED na receptor endogenního hormonu a inhibice nebo aktivace signální dráhy spjaté s receptorem. Dalším mechanismem může být interakce s některou z molekul signální dráhy spjaté s receptorem. ED mohou také stimulovat nebo naopak inhibovat přímo syntézu určitého hormonu nebo stimulovat či inhibovat expresi receptoru pro tento hormon (Combarnous & Nguyen, 2019). ED ovlivňují organismus i na epigenetické úrovni a přenáší tak svůj efekt do dalších generací. Mezi epigenetické mechanismy, kterými ED působí, patří methylace DNA, modifikace histonů a působení na nekódující RNA (Walker & Gore, 2017).

Mezi nejznámější ED patří bezpochyby dichlorofenyltrichlorethan (DDT), pesticid, jehož použití bylo pro širokou škálu negativních účinků v minulém století zakázáno. Studie ovšem ukazují, že DDT a jeho metabolity přetrvávají v prostředí, především v půdě (Ricking & Schwarzbauer, 2012). U DDT a jeho analogů byla potvrzena vazba na ER α , Estrogen-related receptor gamma (ERR γ) a androgenní receptor (AR). U AR působí DDT jako antagonist, naopak u ER α upreguluje jeho funkci. DDT a jeho analogy a metabolity mají tak estrogenní efekt na organismy, což může způsobovat celou řadu negativních následků u samců i samic (Kelce et al., 1995; Zhuang et al., 2012).

V 80. letech minulého století byl na trh uveden další velmi účinný pesticid methoxychlor, který se nějakou dobu používal jako substitute právě za DDT. Methoxychlor je endokrinním disruptorem, který ovlivňuje organismus interferencí s endokrinním systémem na různých úrovních. Bylo potvrzeno, že u hlodavců methoxychlor downreguluje expresi genů pro receptory, např. pro receptor luteinizačního hormonu (Armenti et al., 2008). Dalším účinkem je ovlivnění exprese steroidogenních enzymů, mezi které patří Steroid Acute regulatory protein (StAR) a Cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450scc), které jsou součástí metabolismu cholesterolu, ze kterého se syntetizují steroidní hormony. Methoxychlor downreguluje také expresi genu pro aromatázu, která v organismu zajišťuje konverzi testosteronu na estradiol. Změny hladin těchto enzymů mají za následek disrupci syntézy a metabolismu steroidních hormonů (Armenti et al., 2008; Basavarajappa et al., 2011). Methoxychlor ovlivňuje endokrinní systém i na epigenetické úrovni. To bylo potvrzeno v transgenerační studii na ováriích potkana, kde byl pozorován zvýšený výskyt reprodukčních

problémů jako primární ovariální insuficience (POI) nebo polycystic ovarian disease (PCO) v F3 generaci, která methoxychloru nebyla přímo vůbec vystavena (Manikkam et al., 2014). U plodů vystavených methoxychloru prenatálně byla v ovariu pozorována hypermethylace CpG v promotoru ER β , což mělo v dospělosti za následek disrupci metabolismu estrogenu (Zama & Uzumcu, 2009).

Od konce 20. století jsou velmi studovanou skupinou ED bisphenoly. K nejznámějším zástupcům patří bisphenol A (BPA) používaný při výrobě epoxidových pryskyřic, termopapíru a plastových předmětů, mezi které patří zejména obaly a dózy na potraviny. Od průmyslového využití BPA se ve světě postupně upouští, protože se začínají ukazovat jeho negativní účinky na organismus savců a člověka. BPA je obecně považován za xenoestrogen. Byla potvrzena jeho interakce s estrogenními receptory ER α a ER β a kompetice o vazbu na tyto receptory s jejich přirozeným substrátem estradiolem (Gould et al., 1998; Matthews et al., 2001). Stejně tak se BPA váže na ERR γ a ovlivňuje signalizaci spjatou s tímto receptorem (Takayanagi et al., 2006). BPA účinkuje na organismus také na úrovni ovlivnění syntézy hormonů. V ovariu potkana a prasete byla pozorována po vystavení BPA disrupce exprese genů pro enzymy účastníci se steroidogeneze, jako je StAR, P450scc a aromatáza. To mělo za následek změny v rovnováze steroidních hormonů, a tím narušení funkce ovaria (Mlynarčíková et al., 2005; Zhou et al., 2008). Následkem vystavení organismu BPA může být i rozvoj komplexnějších onemocnění, jako je PCOS nebo hormonálně asociované karcinomy (Gao et al., 2015; Rutkowska & Rachoń, 2014).

Kvůli mnoha negativním účinkům se BPA začíná ve výrobcích nahrazovat jeho strukturálním analogem bisphenolem S (BPS). BPS je mnohem méně známou sloučeninou a jeho efekty na organismus nejsou tak dobře prostudovány jako u jeho předchůdce BPA. Přesto studie naznačují, že BPS má potenciál být minimálně stejně škodlivý pro zdraví jako BPA (Žalmanová et al., 2016). BPS vykazuje stejně jako BPA estrogenní aktivitu a díky jeho přítomnosti v organismu dochází k disrupci hladin hormonů HPG osy. Byla potvrzena interakce BPS s estrogenními receptory ER α a ER β , na které se BPS váže a působí jako agonista (Molina-Molina et al., 2013). BPS také interagoval s GnRH a měl vliv i na expresi steroidogenního enzymu aromatáza (Ji et al., 2013). U ryb způsoboval BPS na základě disrupce hladin pohlavních hormonů růstovou restrikcí a posun poměru pohlaví u plodů (Naderi et al., 2014). U potkana byly pozorovány negativní efekty na ovaria, kde docházelo vlivem BPS k tvorbě cyst a zvýšené atrezii folikulů (Ahsan et al., 2018). Negativní pohled na rostoucí využití BPS ovlivňuje také fakt, že BPS je více rezistentní vůči degradaci a déle

zůstává v prostředí než jeho analog BPA (Danzl et al., 2009). Mezi sloučeniny s bisphenolní strukturou se řadí i triclosan, kterým se zabývá tato práce.

4. Triclosan

Triclosan, neboli 5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol, je fenolická sloučenina, která je součástí mnoha předmětů denní potřeby. Triclosan se komerčně využívá především kvůli svým antibakteriálním účinkům a najdeme ho tak v antibakteriálních mýdlech, deodorantech, ústních vodách, čistících a dezinfekčních prostředcích, ale také v lacích na nábytek či v plastovém nádobí, často pod obchodní značkou Irgasan DP 300 (Bedoux et al., 2012). Medicínské využití nachází zejména v dezinfekci chirurgických nástrojů jako prevence postoperační infekce (Ahmed et al., 2019).

Ve většině zemí je regulován přídavek triclosanu do výrobků na 0,3% (Bedoux et al., 2012). Triclosan má ovšem schopnost akumulace ve vodě, vodních organismech, půdě a některých rostlinách, takže jeho koncentrace v prostředí může být ve výsledku poměrně vysoká. Do organismu se tato sloučenina dostává požitím kontaminované vody či potravy, absorpcí přes kůži a ústní sliznici (Olaniyan et al., 2016). Studie monitorující výskyt triclosanu v povrchových vodách v Evropě, USA, Číně, Japonsku a Austrálii ukazují koncentraci od desetin po desetitisíce nanogramů (Bedoux et al., 2012). Průměrně 3,5 ng/L bylo detekováno také ve vzorcích pitné vody v Číně (Li et al., 2010). V povrchových vodách podléhá triclosan fotodegradaci, jejíž hlavním produktem je 2,8-dichlorodibenzo-P-dioxin (2,8-DCDD), který je perzistentní a pravděpodobně více toxický než samotný triclosan (Aranami & Readman, 2007). Na základě lipofilní povahy a vysokého adsorpčního potenciálu ($K_{ow} = 4,76$) se předpokládá schopnost triclosanu bioakumulace v organismech (Dhillon et al., 2015). Bioakumulace je studována zejména u sladkovodních živočichů (Balmer et al., 2004; Das Sarkar et al., 2020). U savců a člověka se triclosan v nejvyšší koncentraci objevuje v moči (Calafat et al., 2008; Iyer et al., 2018), ale byl detekován také v krvi (Allmyr et al., 2006, 2008), tukové tkáni, játrech (Geens et al., 2012) a mateřském mléce (Adolfsson-Erici et al., 2002; Allmyr et al., 2006). Triclosan je v těle savců metabolizován v játrech. Zde jako u jiných xenobiotik dochází k jeho glukuronidaci a sulfataci v jaterních mikrozomech a cytosolu (Wang et al., 2004).

Hlavním důvodem využití triclosanu v kosmetickém průmyslu a medicíně jsou jeho antibakteriální vlastnosti. Triclosan je účinný proti některým kmenům gramnegativních i grampozitivních bakterií. Bakteriostatický efekt spočívá v narušení struktury bakteriální membrány a inhibici bakteriálního enzymu enoyl-acyl carrier reductáza, který je součástí dráhy pro syntézu mastných kyselin (Guillen et al., 2004; McMurry et al., 1998). Mnoho bakterií si ovšem na triclosan vyvinulo rezistenci díky amplifikaci genu *FabI* nebo jeho

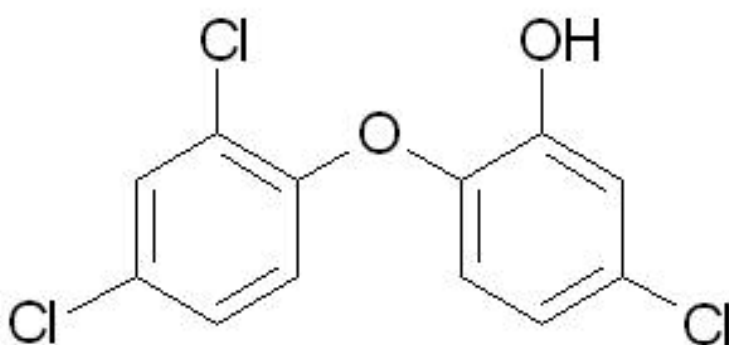
mutacím nebo se u nich vyvinuly specifické efluxní pumpy v membráně pro přímé odstranění triclosanu z buňky (Ciusa et al., 2012; Chuanchuen et al., 2003). Rezistence k triclosanu také přímo ovlivňuje rezistenci ke komerčně využívaným beta laktamovým antibiotikům jako je amoxicilin, ampicilin nebo cephalexin. (Lu et al., 2018).

Neméně závažným negativním efektem komerčního využití triclosanu je jeho potenciální endokrinně disruptivní efekt, na nějž se mimo jiných zaměřuje i tato práce. Možná funkce triclosanu jako endokrinního disruptoru se předpokládá na základě jeho molekulární struktury. Triclosan obsahuje dvě fenolické skupiny, které se vyskytují i ve struktuře jiných endokrinních disruptorů, jako jsou bisphenoly nebo polychlorované bisphenoly a také antropogenní estrogény (Wang & Tian, 2015). Studie endokrinně disruptivního efektu triclosanu se hojně provádí na rybách, které jsou podle dosavadních výsledků na triclosan citlivější než savci. U modelového organismu *Danio rerio* byly pozorovány negativní efekty triclosanu na syntézu thyroïdních hormonů, kromě toho u jedinců vystavených triclosanu v koncentraci 40µg/L docházelo ke změně poměru pohlaví (Stenzel et al., 2019). Vliv triclosanu byl pozorován i u ovarií samic druhu *Danio rerio*. Zde docházelo k downregulaci exprese genů pro antioxidační enzymy superoxiddismutáza, kataláza a glutathion peroxidáza, což naznačuje možnost akumulace reaktivních forem kyslíku (ROS) v ovariích a vyšší šanci poškození buněk. Kromě toho docházelo k nárůstu proapoptotických markerů v buňkách ovarií jako odpověď na triclosan v koncentracích 34 ug/L a 68 ug/L (Wang et al., 2020). U ryby katla obecná prezentují Adhikari et al., 2023 možnou schopnost triclosanu ovlivnit hormony hypothalamo-hypofyzární osy. To vede díky zvýšené produkci kisspeptinu a zvýšené funkci aromatázy k nadměrné produkci 17β-estradiolu. Estrogenní vliv triclosanu byl pozorován i u kapra *Cyprinus carpio* či u medaky *Oryzias latipes* (Ishibashi et al., 2004; Wang et al., 2017).

U savců byly studovány efekty triclosanu na thyroïdní hormony (T3, T4) a hormony systému HPG osy. U myši byl pozorován signifikantní pokles hormonů štítné žlázy T3 a T4 stejně jako nadměrná produkce prolaktinu, která narušuje rovnováhu hormonů HPG osy (Cao et al., 2018). U potkanů byl v několika studiích prokázán efekt na urychlení pohlavního dospívání samic a opoždění nástupu puberty u samců na základě estrogenních účinků triclosanu (Rodríguez & Sanchez, 2010; Stoker et al., 2010), naopak některé studie tento efekt vyvracejí (Montagnini et al., 2018). Předmětem výzkumu byl také efekt na placentu, ve které se triclosan efektivně akumuluje. U potkanů bylo pozorováno signifikantní snížení hladiny hCG, progesteronu a testosteronu, který u těchto savců slouží jako jako substrát pro syntézu estrogenů v *Corpus luteum*. Naopak zvýšená byla exprese genů pro receptory steroidních

hormonů (Feng et al., 2016). U ovcí fungoval triclosan v placentě jako inhibitor enzymu sulfottransferáza, který zajišťuje sulfataci estrogenu pro udržení těhotenství a správný vývoj plodu. Triclosan v tomto případě působil jako kompetitivní inhibitor estrogenu (James et al., 2010).

In vitro studie se zaměřují také na vliv triclosanu na granulózní buňky, které mají důležitou endokrinně-reprodukční roli. U potkana byl prokázán nárůst hladiny estradiolu a progesteronu syntetizovaných buňkami granulózy v závislosti na zvyšující se koncentraci triclosanu v médiu. Kromě toho byla pozorována upregulace některých steroidogenních enzymů, jako je aromatáza nebo StAR. Chen et al., 2019 předpokládají, že triclosan by mohl působit na steroidogenezi v granulózních buňkách přes cAMP/PKA signální dráhu, která právě ovlivňuje syntézu výše zmíněných steroidogenních enzymů. Tuto možnost ukazuje i studie na lidských granulózních buňkách, která poukazuje na zvýšenou spotřebu glukózy pro steroidogenezi a zvýšenou hladinu glykolýzy jako možnou odpověď na poškození mitochondrií (Du et al., 2021). Naopak studie na granulózních buňkách prasete ukazuje opačný efekt triclosanu, tedy inhibici produkce estradiolu a progesteronu (Basini et al., 2022). Recentní studie vlivu triclosanu na samotné oocyty poukazuje na zvýšenou produkci ROS a zvýšenou apoptózu mitochondrií u oocytů vystavených triclosanu. To vede k oxidativnímu stresu a možnému poškození DNA, což má za následek defekty v maturaci oocytů a vývoji folikulů (Park et al., 2020).



Obrázek 1: Strukturní vzorec triclosanu. Převzato z Delgado et al., 2011.

5. Hypotéza a cíle práce

Na základě studia odborné literatury byla stanovena hypotéza, podle které triclosan negativně ovlivňuje meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*.

Na základě této hypotézy byly pro její ověření stanoveny cíle práce:

1. Zhodnotit vliv triclosanu na meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*
2. Zhodnotit vliv triclosanu na utváření cytoskeletárních struktur meiotického vřeténka
3. Zhodnotit vliv triclosanu na acetylaci α -tubulinu a stabilitu mikrotubulů meiotického vřeténka
4. Zhodnotit vliv triclosanu na expresi a kvalitu mitochondrií během meiotického zrání
5. Zhodnotit vliv triclosanu na změny v epigenetických modifikacích H3K4me2 a 5mC
6. Zhodnotit vliv triclosanu v kombinaci s 3 pM bisphenolem S na meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*
7. Zhodnotit vliv triclosanu v kombinaci s 3 pM bisphenolem S na utváření cytoskeletárních struktur meiotického vřeténka
8. Zhodnotit vliv triclosanu v kombinaci s 3pM bisphenolem S na acetylaci α -tubulinu a stabilitu mikrotubulů meiotického vřeténka

6. Materiály a metodika

6.1. Chemikálie

Médium M199 (Gibco, UK)

Bovinní fetální sérum (GincoBRL, Life Technologies, Germany)

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

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

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

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

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

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

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

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

NaN₃ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

NGS (Abcam, Cambridge, UK)

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

Vectashield s DAPI (Thermo FisherScientific, USA)

Anti- α -Tubulin, T6199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Anti-Acetyl- α -Tubulin, mAb5335 (Cell Signaling Technology, Danvers, USA)

Anti-Tomm20, ab186735 (Abcam, Cambridge, UK)

Anti-SIRT3, ab40963 (Abcam, Cambridge, UK)

Anti-Histone H3 (dimehyl K4), ab7766 (Abcam, Cambridge, UK)

Anti-5-Methylcytosine, SAB2702243 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

kozí anti-myší IgG sekundární protilátka konjugovaná s FITC, ab150117 (Abcam, Cambridge, UK)

kozí anti-králičí IgG sekundární protilátka konjugovaná s TRITC, ab150086 (Abcam, Cambridge, UK)

6.2. Získávání a izolace oocytů

Prasečí ovaria byla získána z jatečných prepubertálních prasnic. Ovaria byla převezena do laboratoře v termolahvích pro udržení fyziologické teploty. Následně probíhala izolace folikulární tekutiny s COC z folikulů o velikosti 2-5 mm. Izolace byla prováděna metodou aspirace podtlakem pomocí injekční stříkačky a jehly o velikosti 18G. Folikulární tekutina byla po odebrání přemístěna do Petriho misky a pod binokulární lupou byly vybrány meioticky kompetentní oocyty. Hodnocení meiotické kompetence probíhalo na základě tří kritérií: velikost oocytu byla 120 μm , oocyt měl homogenní cytoplasmu a byl obklopen alespoň třemi souvislými vrstvami kumulárních buněk.

6.3. Kultivace oocytů

Vyselektované oocyty byly promyty v supernatantu folikulární tekutiny a následně přeneseny do modifikovaného kultivačního média M199. Médium M199 bylo obohaceno o folikulární tekutinu (100 $\mu\text{l/ml}$), HEPES (1 mg/ml), hydrogenuhličitan sodný (20 $\mu\text{l/ml}$), 5% fetální bovinní sérum, laktát vápenatý (0,6 mg/ml), gentamycin (0,025 mg/ml), lidský choriový gonadotropin (hCG) a koňský choriový gonadotropin (eCG) v poměru 13,5:6,6 IU/ml. Triclosan byl rozpuštěn v DMSO a jeho finální koncentrace byla vždy 0,01 %.

Kultivace probíhala ve 4-jamkových kultivačních destičkách s 1 ml modifikovaného kultivačního média. Oocyty byly rozděleny do čtyř skupin. V jedné jamce se nacházela kontrolní skupina bez přídatku triclosanu, která byla ošetřena pouze 0,01 % DMSO. Zbylé tři skupiny oocytů byly ošetřeny finálními koncentracemi triclosanu 2,5nM, 250 nM a 25 μM . Oocyty byly kultivovány po dobu 48 hodin v inkubátoru při teplotě 38 °C a atmosféře s 5 % CO_2 .

6.4. Fixování oocytů

Po 48 hodinách byly oocyty v promývacím roztoku zbaveny kumulárních buněk pomocí nasávání do tenkostěnné kapiláry. Po odstranění kumulárních buněk byly oocyty promyty ve třech kapkách PBS-PVA a následně fixovány po dobu 30 minut v 1 ml roztoku 4 % paraformaldehydu v PBS. Po 30 minutách byly přeneseny do skladovacího roztoku PBS s NaN_3 a krátkodobě uchovávány při 4°C.

6.5. Imunocytochemické barvení

Prvním krokem imunocytochemického barvení byla permeabilizace cytoplasmatické membrány v 1 ml 0,1% roztoku TritonX-100 v PBS-NaN₃. Permeabilizace probíhala po dobu 40 minut při laboratorní teplotě. Dalším krokem byla blokace nespecifických vazebných míst pro protilátky. Blokace probíhala v 1 ml 5 % NGS po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Následovala inkubace oocytů s primární protilátkou ve 12-jamkové destičce. Primární protilátky byly ředěny v 1 % NGS a do každé jamky bylo napipetováno 45 μ l. Pro následnou inkubaci oocytů s primární protilátkou byly z kontrolní skupiny odebrány dva oocyty sloužící jako negativní kontrola specifity vazby protilátky. Negativní kontrola byla na rozdíl od ostatních skupin přenesena do 1 % NGS bez přídavku primární protilátky. Inkubace s primární protilátkou probíhala po dobu 1 hodiny v inkubátoru při teplotě 38 °C a atmosféře s 5 % CO₂. Po jedné hodině byly oocyty 2x promyty v 1 ml 1 % NGS, vždy po dobu 5 minut. Následovala inkubace všech skupin se sekundární protilátkou ředěnou opět v 1 % NGS. Inkubace probíhala ve tmě po dobu 1 hodiny v inkubátoru při teplotě 38 °C a atmosféře s 5 % CO₂. Poté byly všechny skupiny promyty v 1 ml 1 % NGS po dobu 3 x 5 minut. Následovalo montování do 3 μ l kapky Vectashieldu s DAPI na teflonové podložní sklíčko.

6.5.1. Lokalizace α -tubulinu

Po permeabilizaci a blokaci byly oocyty inkubovány s myší primární monoklonální protilátkou anti- α -tubulin (T6199) ředěnou v poměru 1:1000 v 1 % NGS. Po oplachu z primární protilátky následovala inkubace oocytů s kozí anti-myší IgG sekundární protilátkou konjugovanou s FITC (ab150117). Sekundární protilátka byla ředěna rovněž v 1 % NGS v poměru 1:200. Poté následoval oplach a montování na teflonové sklíčko.

6.5.2. Lokalizace Acetyl- α -tubulinu

Po permeabilizaci a blokaci byly oocyty inkubovány s králičí primární monoklonální protilátkou anti-Acetyl- α -tubulin (mAb5335) ředěnou v 1 % NGS v poměru 1:150. Po oplachu z primární protilátky následovala inkubace oocytů s kozí anti-králičí IgG sekundární protilátkou konjugovanou s TRITC (ab150086). Sekundární protilátka byla ředěna v 1 % NGS v poměru 1:200. Posledním krokem byl oplach a montování na teflonové sklíčko.

6.5.3. Lokalizace SIRT3

Po permeabilizaci a blokaci byly oocyty inkubovány s králičí primární monoklonální protilátkou anti-SIRT3 (ab40963) ředěnou v poměru 1:100 v 1 % NGS. Po oplachu z primární

protilátky následovala inkubace s kozí anti-králičí IgG sekundární protilátkou konjugovanou s TRITC (ab150086), ředění v poměru 1:200. Poté následoval oplach a montování na teflonové sklíčko.

6.5.4. Lokalizace TOMM20

Po permeabilizaci a blokaci byly oocyty inkubovány s králičí primární monoklonální protilátkou anti-TOMM20 (ab186735) ředěnou v 1 % NGS v poměru 1:750. Po oplachu z primární protilátky následovala inkubace s kozí anti-králičí IgG sekundární protilátkou konjugovanou s TRITC (ab150086), ředění v poměru 1:200 v 1 % NGS. Následoval oplach a montování na teflonové sklíčko.

6.5.5. Lokalizace H3K4me2

Po permeabilizaci a blokaci byly oocyty inkubovány s králičí primární monoklonální protilátkou anti-H3K4me2 (ab7766), ředění v 1 % NGS v poměru 1:1000. Po oplachu z primární protilátky následovala inkubace s kozí anti-králičí IgG sekundární protilátkou konjugovanou s TRITC (ab150086) ředěnou v 1 % NGS v poměru 1:200. Poté následoval oplach a montování na teflonové sklíčko.

6.5.6. Lokalizace 5mC

Po permeabilizaci a blokaci byly oocyty inkubovány s myší monoklonální protilátkou anti-5mC konjugovanou s FITC (SAB2702243) ředěnou v 1 % NGS v poměru 1:50. Následoval oplach a montování na teflonové sklíčko.

6.6. Fluorescenční mikroskopie a analýza obrazu

Namontované oocyty byly snímány pomocí fluorescenčního mikroskopu Leica DM LB. Následně byla prováděna analýza obrazu. V programu ImageJ byla hodnocena intenzita fluorescence vizualizovaných struktur v oocytech či celých oocytů v případě barvení mitochondrií. Průměrné naměřené hodnoty v experimentálních skupinách pak byly vyjádřeny jako poměr k průměrným naměřeným hodnotám ve skupině kontrolní.

6.7. Statistická analýza

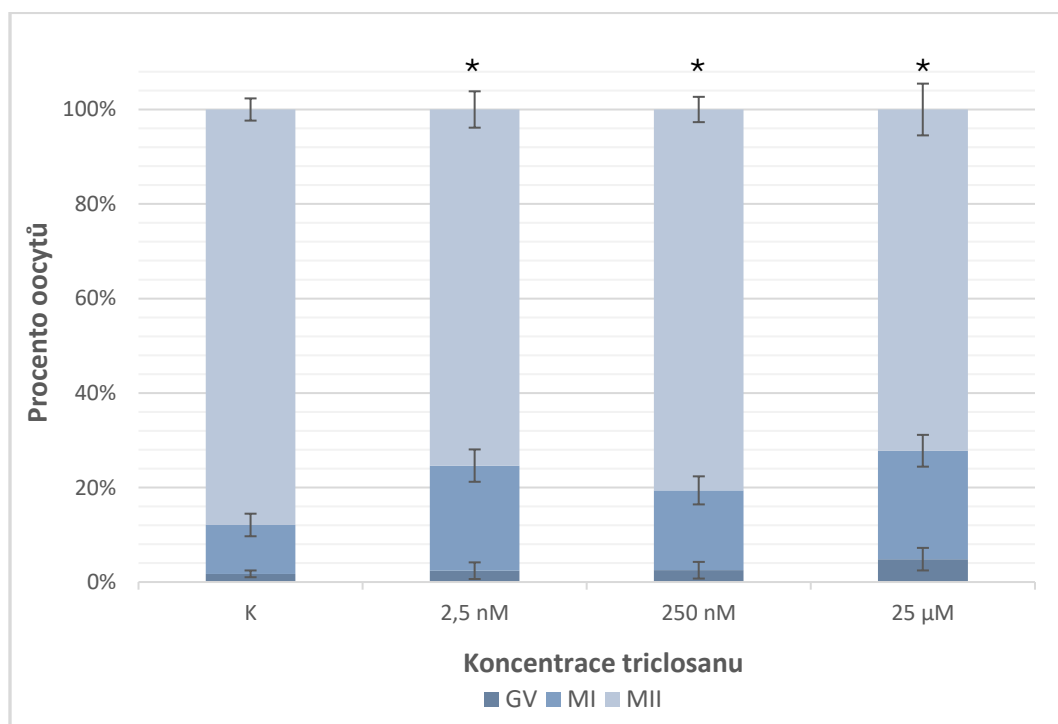
Statistická analýza byla provedena s využitím programovacího jazyka Python. Pro vyhodnocení vlivu triclosanu a triclosanu v kombinaci s bisphenolem S byl zvolen Chí kvadrát test a Fischerův exaktní test pro post-hoc testování. Pro vyhodnocení vlivu triclosanu a triclosanu v kombinaci s bisphenolem S na utváření meiotického vřeténka byl zvolen Chí kvadrát test. Pro experimenty vycházející z hodnocení intenzity fluorescence byl proveden

neparametrický T-test. Za statisticky významný byl výsledek považován v případě hodnoty $p < 0,05$.

7. Výsledky

7.1. Vliv triclosanu na meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*

Prvním cílem bylo sledovat vliv tří vybraných koncentrací triclosanu na průběh meiotického zrání prasečích oocytů *in vitro*. Oocyty byly kultivovány po dobu 48h v médiu s celkovými přídávky triclosanu v koncentracích 2,5 nM, 250 nM a 25 μ M. Poté byla na základě vizualizace chromatinu u každého oocyty hodnocena progresse meiotickým zráním. Oocyty, které nevystoupily z I. meiotického bloku, zůstaly ve stadiu zárodečného vřívku GV. U oocytů, které znovuzahájily meiózu, byla progresse zpomalena a dosáhly jen stadia MI nebo probíhala normálně a tyto oocyty byly ve stadiu MII. Z grafu 1 je patrné, že všechny tři testované koncentrace triclosanu negativně ovlivňují schopnost oocyty po 48 hodinách dosáhnout stadia MII a bylo pozorováno statisticky významné narušení zrání prasečích oocytů pod vlivem triclosanu.

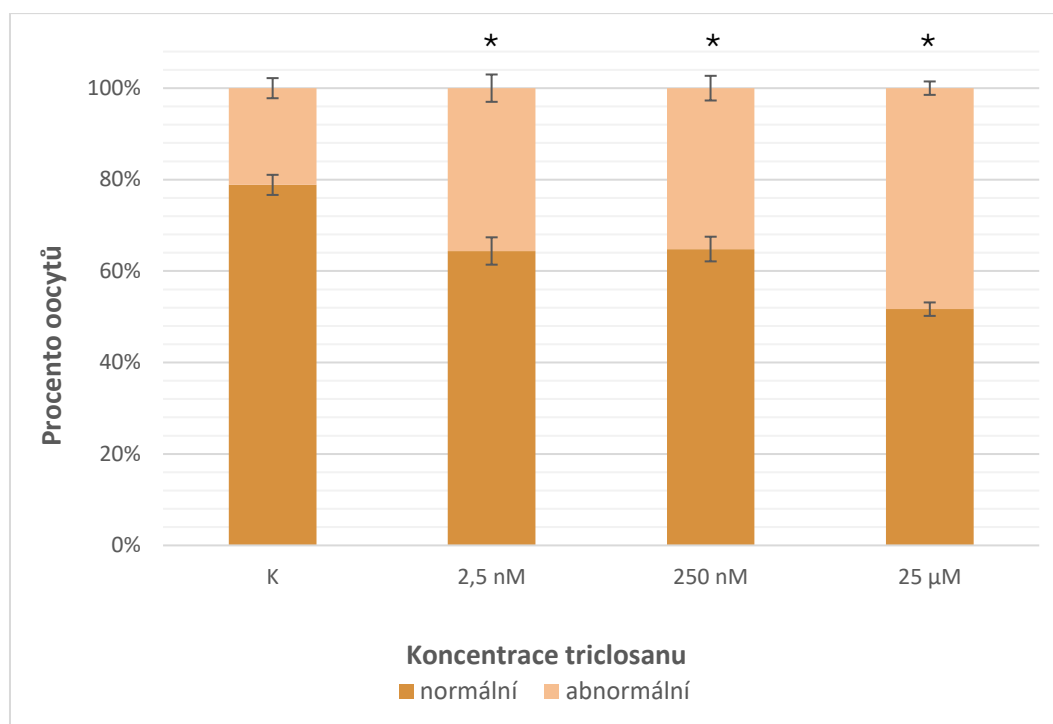


Graf 1: Vliv triclosanu na průběh meiotického zrání.

GV – oocyt ve stadiu zárodečného vřívku, MI – oocyt v metafázi I, MII – oocyt v metafázi II. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Data jsou vyobrazena jako průměr \pm střední chyba průměru z 11 nezávislých experimentů, $n \geq 10$ oocytů na skupinu.

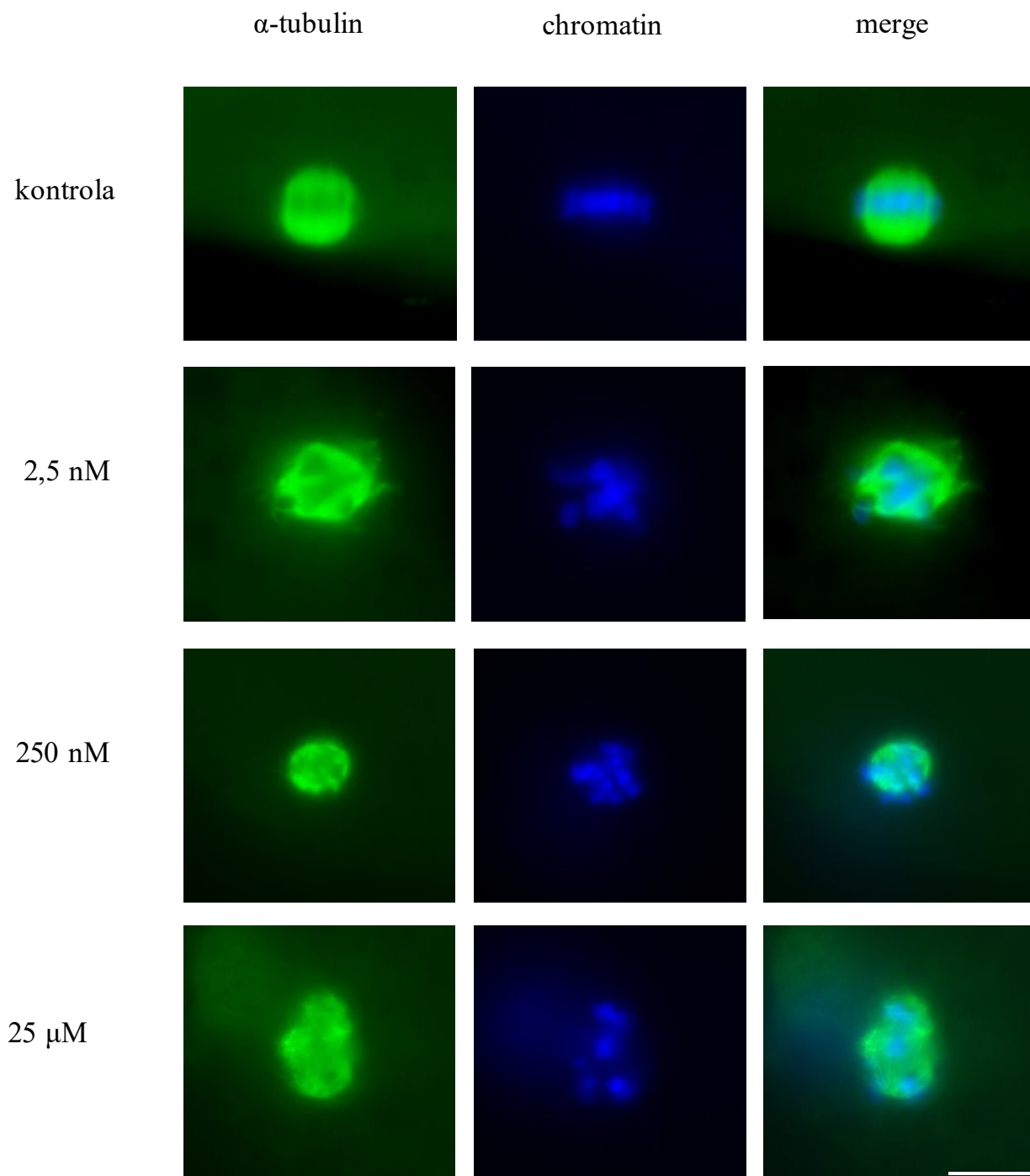
7.2. Vliv triclosanu na utváření cytoskeletárních struktur meiotického vřeténka

Druhým cílem bylo pozorovat a vyhodnotit vliv triclosanu na utváření meiotického vřeténka. Meiotické vřeténko bylo vizualizováno pomocí imunocytochemické lokalizace α -tubulinu. Následně byla na základě mikroskopických snímků hodnocena morfologie meiotického vřeténka. Jako normální byla vyhodnocena bipolární vřeténka se správně napojenými chromozomy seřazenými v ekvatoriální rovině. Mezi nejčastější defekty vřeténka patřilo snížení hustoty tubulinových vláken a výrazné zmenšení vřeténka. S menší četností bylo pozorováno neukotvené vlákno tubulinu, chybné napojení chromozomu a monopolární či tripolární uspořádání meiotického vřeténka. Signifikantní negativní vliv triclosanu na utváření meiotického vřeténka byl pozorován u všech tří testovaných koncentrací, jak je patrné z grafu 2.



Graf 2: Vliv triclosanu na utváření meiotického vřeténka

Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Data jsou vyobrazena jako průměr \pm střední chyba průměru z 16 nezávislých experimentů, $n \geq 10$ oocytů na skupinu.

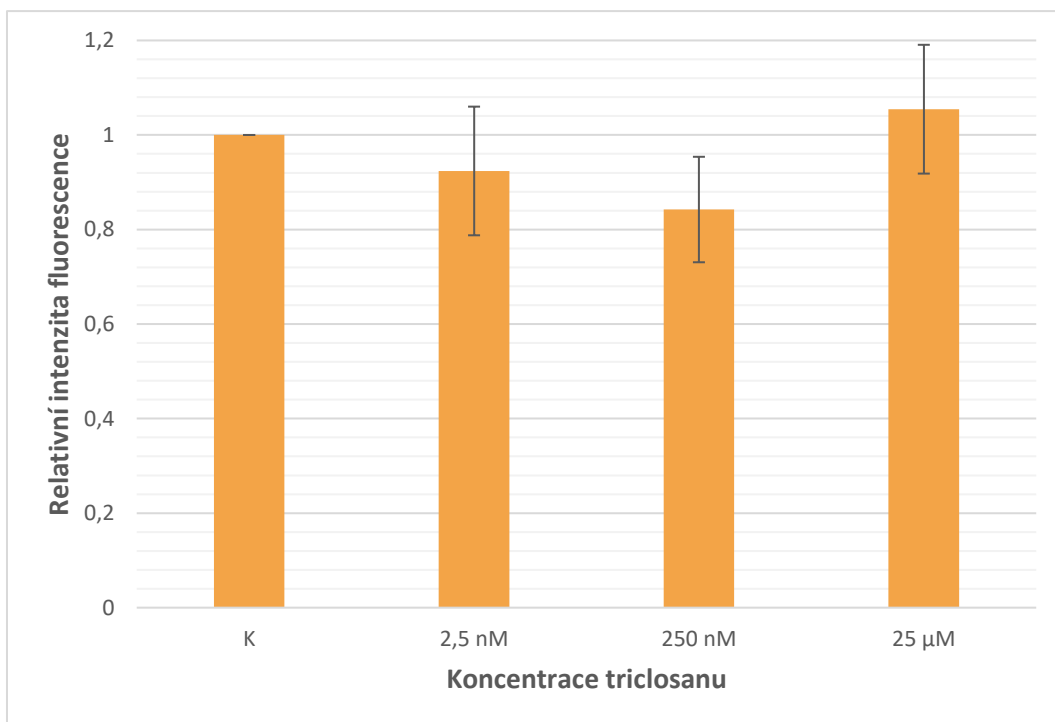


Obrázek 2: Pozorované defekty meiotického vřeténka

Reprezentativní obrázky představují příklady pozorovaných defektů ve skupinách oocytů ošetřených 2,5 nM, 250 nM a 25 μ M triclosanem a kontrolu. α -tubulin je vyobrazen zeleně a chromatin modře. Sloupec merge představuje spojení α -tubulinu a chromatinu. Měřítka uvedené v pravém dolním rohu platí pro všechny obrázky a odpovídá 10 μ m.

7.3. Vliv triclosanu na acetylaci α -tubulinu a stabilitu mikrotubulů meiotického vřeténka

V tomto experimentu byl sledován vliv tří experimentálních koncentrací triclosanu na acetylaci α -tubulinu. Konkrétně acetylaci na lysinu 40, což je obvyklá posttranslační modifikace ovlivňující stabilitu mikrotubulů meiotického vřeténka. U testovaných skupin byla hodnocena intenzita fluorescence, která byla následně vztažena ke kontrolní skupině a vyjádřena jako relativní intenzita fluorescence. Z grafu 3 je patrné, že žádný z rozdílů mezi testovanými skupinami nebyl vyhodnocen jako statisticky významný. Rozdíly v acetylaci α -tubulinu oproti kontrole nebyly tedy pozorovány u žádné z testovaných skupin.

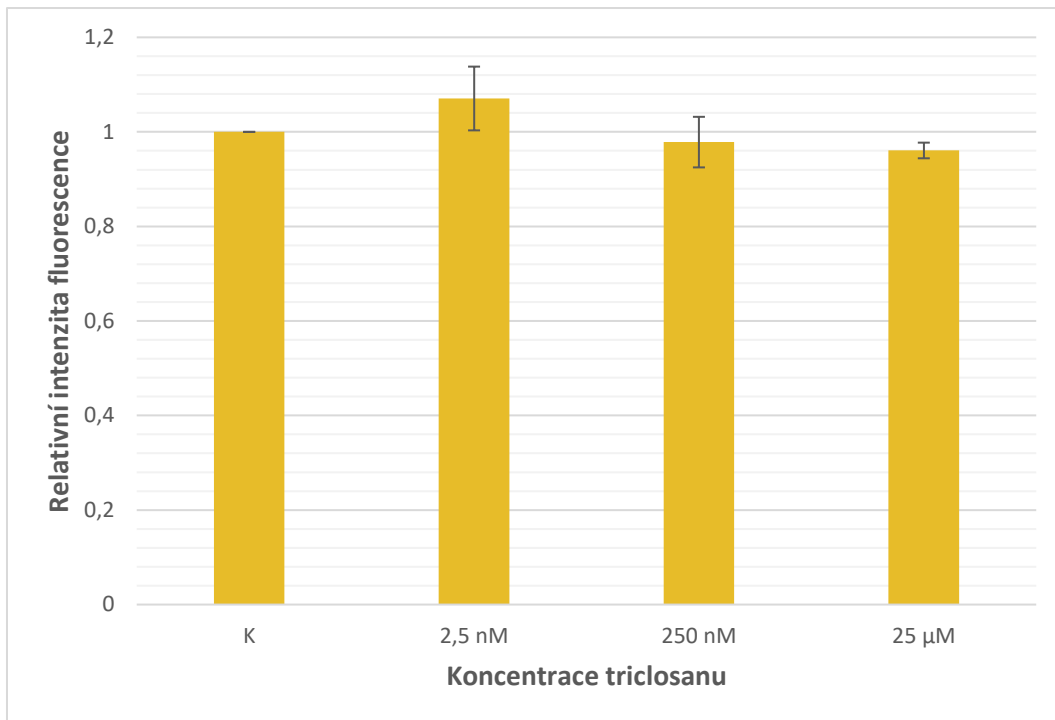


Graf 3: Vliv triclosanu na acetylaci α -tubulinu

Data jsou vyobrazena jako průměr \pm střední chyba průměru ze 3 nezávislých experimentů, $n \geq 10$ oocytů na skupinu.

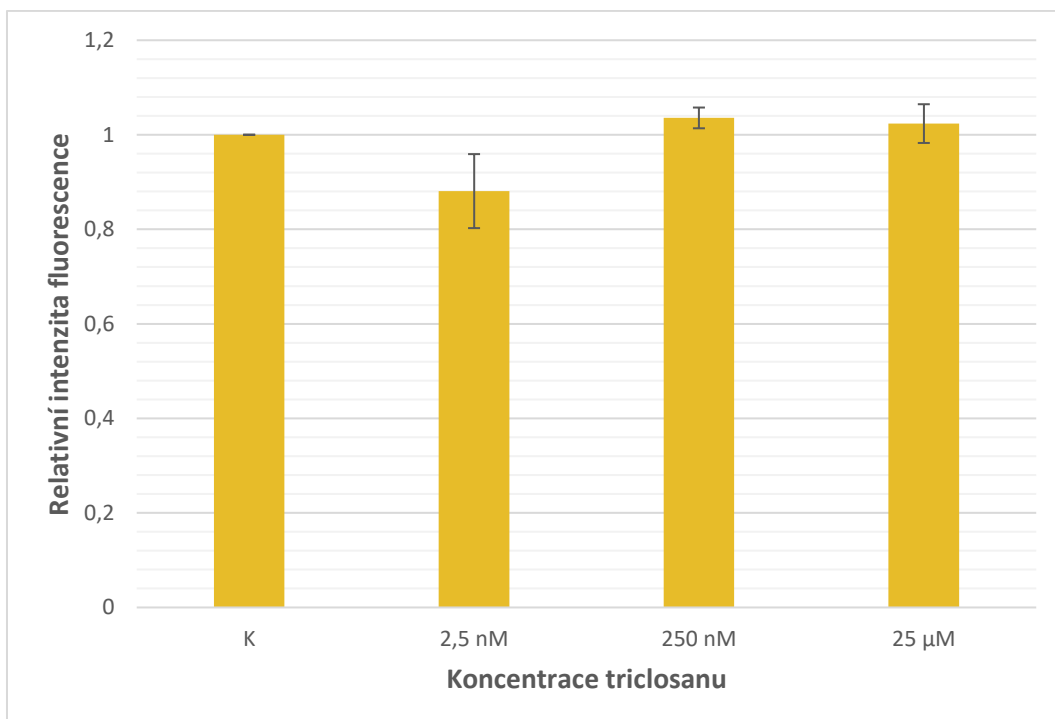
7.4. Vliv triclosanu na expresi a kvalitu mitochondrií během meiotického zrání

Čtvrtým cílem bylo sledovat a zhodnotit vliv triclosanu na mitochondrie během meiotického zrání. Mitochondrie byly vizualizovány pomocí imunocytochemické lokalizace mitochondriální NAD-dependentní deacetylázy sirtuinu 3 a proteinu vnější mitochondriální membrány TOMM20. Následně byla hodnocena intenzita fluorescence všech skupin a intenzita skupin s triclosanem byla vztažena ke kontrolní skupině a vyjádřena jako relativní intenzita fluorescence. Signifikantní změny množství a kvality mitochondrií pod vlivem triclosanu o koncentracích 2,5 nM, 250 nM a 25 µM nebyly pozorovány ani u jednoho ze studovaných markerů. Vliv triclosanu na mitochondrie prasečích oocytů během meiotického zrání tak není statisticky významný.



Graf 4: Vliv triclosanu na expresi mitochondrií

Data jsou vyobrazena jako průměr ± střední chyba průměru z 5 nezávislých experimentů, $n \geq 10$ oocytů na skupinu.



Graf 5: Vliv triclosanu na kvalitu a oxidativní poškození mitochondrií

Data jsou vyobrazena jako průměr ± střední chyba průměru z 5 nezávislých experimentů, $n \geq 10$ oocytů na skupinu.

7.5. Vliv triclosanu na změny v epigenetických modifikacích

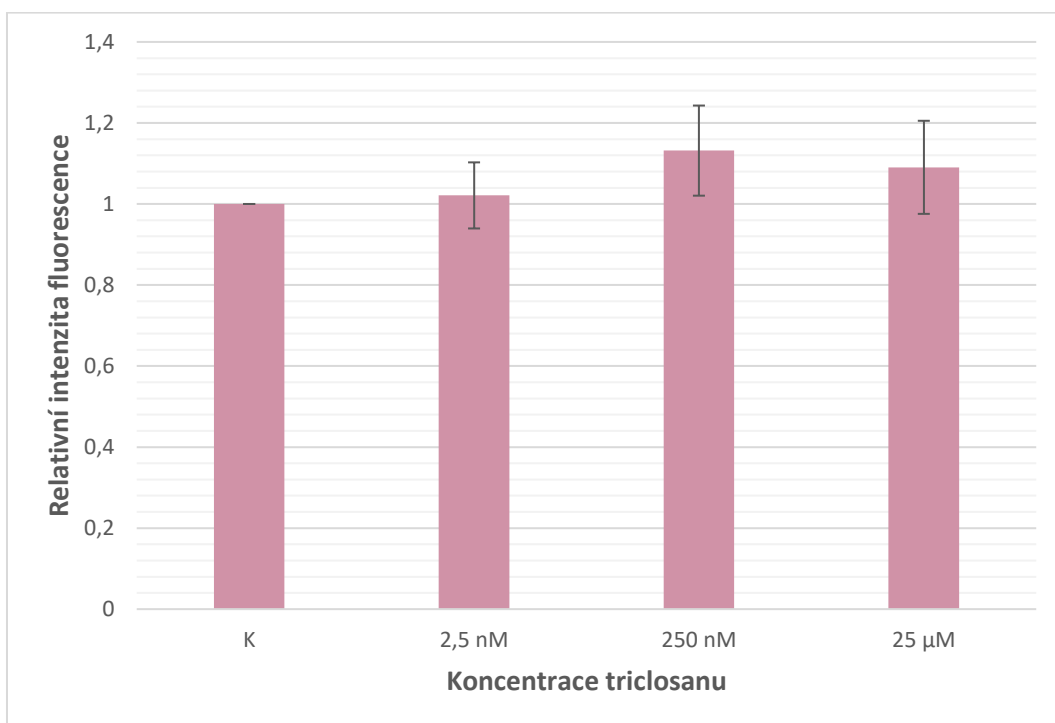
H3K4me2 a 5mC

Cílem tohoto experimentu bylo vyhodnotit vliv jednotlivých koncentrací triclosanu na změnu methylace histonu H3K4me2 (graf 6) a methylace DNA na 5mC (graf 7). Epigenetické modifikace byly imunocytochemicky vizualizovány. Následně byla hodnocena intenzita fluorescence všech skupin a intenzita skupin s triclosanem byla vztažena ke kontrolní skupině a vyjádřena jako relativní intenzita fluorescence. Data ukazují, že v žádné z testovaných skupin nebylo oproti kontrole pozorováno statisticky významné snížení nebo zvýšení intenzity fluorescence u obou epigenetických modifikací.



Graf 6: Vliv triclosanu na změny v methylaci histonu H3K4me2

Data jsou vyobrazena jako průměr \pm střední chyba průměru ze 4 nezávislých experimentů, $n \geq 10$ oocytů na skupinu.



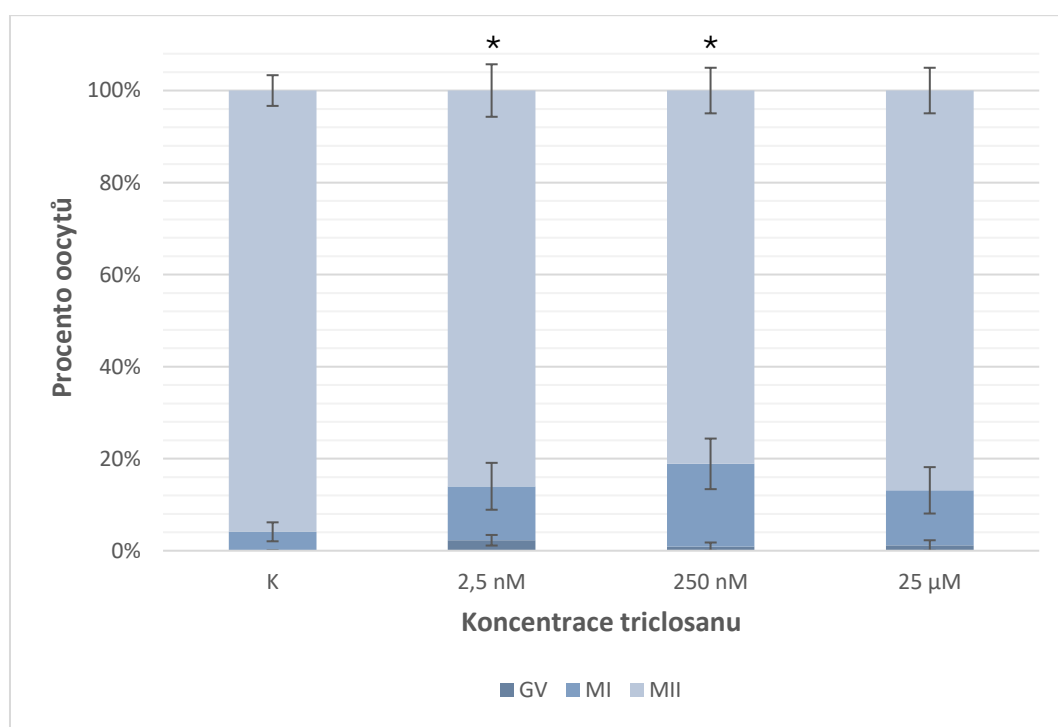
Graf 7: Vliv triclosanu na změny v methylaci 5mC

Data jsou vyobrazena jako průměr \pm střední chyba průměru ze 4 nezávislých experimentů, $n \geq 10$ oocytů na skupinu.

7.6. Vliv triclosanu v kombinaci s 3 pM bisphenolem S na meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*

Po vyhodnocení vlivu samotného triclosanu na prasečí oocyty byl testován vliv triclosanu v koncentracích 2,5 nM, 250 nM a 25 μ M v kombinaci s bisphenolem S. Koncentrace bisphenolu S byla u všech testovaných skupin 3pM. Oocyty byly kultivovány po dobu 48h v médiu s celkovými přídávky těchto látek v daných koncentracích. Poté byla na základě vizualizace chromatinu u každého oocytu hodnocena progresse meiotickým zráním. Oocyty, které nevystoupily z I. meiotického bloku, zůstaly ve stadiu zárodečného váčku GV. U oocytů, které znovuzahájily meiózu, byla progresse zpomalena a dosáhly jen stadia MI nebo probíhala normálně a tyto oocyty byly ve stadiu MII.

Z grafu 8 je patrné, že triclosan v testovaných koncentracích 2,5 nM a 250 nM v kombinaci s 3pM bisphenolem S statisticky významně negativně ovlivňuje meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro* a narušuje schopnost oocytu dosáhnout stadia MII.

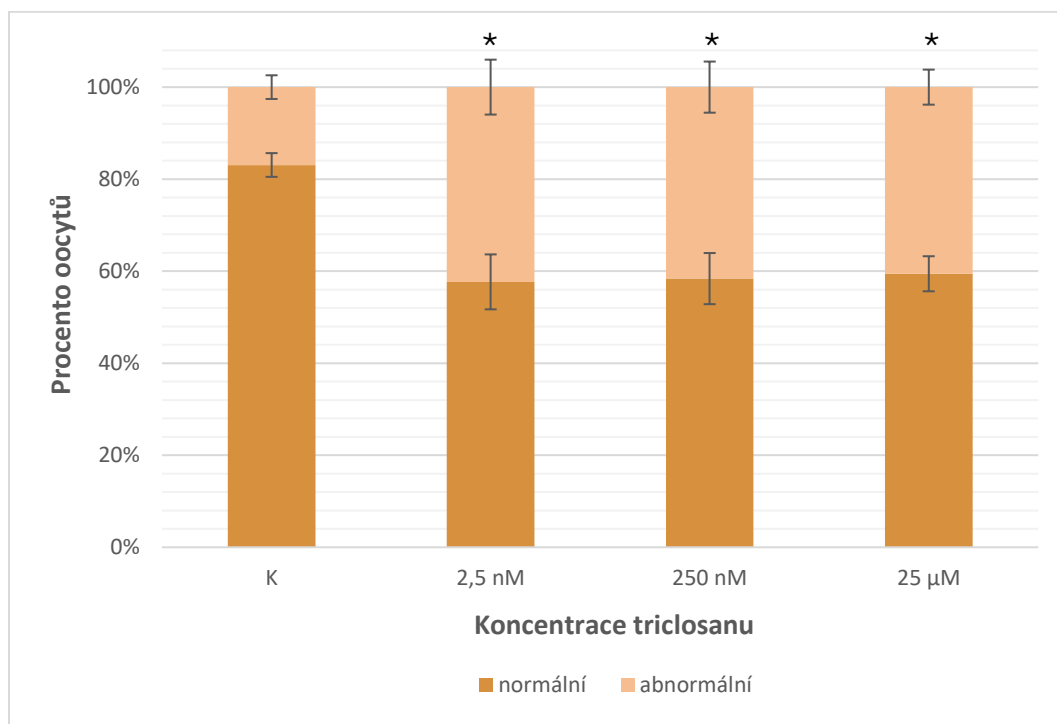


Graf 8: Vliv triclosanu v kombinaci s 3 pM bisphenolem S na průběh meiotického zrání.

GV – oocyt ve stadiu zárodečného váčku, MI – oocyt v metafázi I, MII – oocyt v metafázi II. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Data jsou vyobrazena jako průměr \pm střední chyba průměru z 6 nezávislých experimentů, $n \geq 10$ oocytů na skupinu.

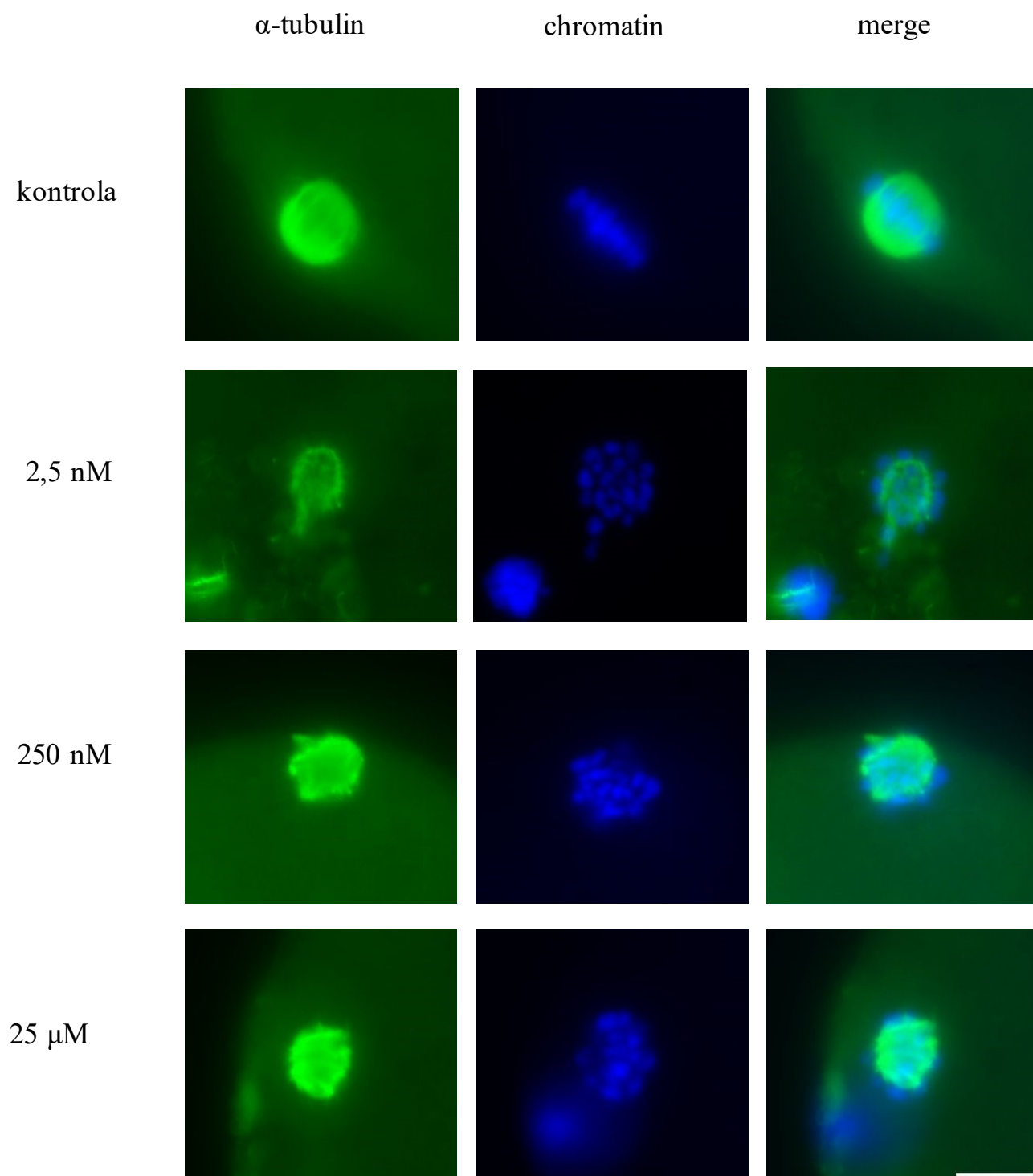
7.7. Vliv triclosanu v kombinaci s 3 pM bisphenolem S na utváření cytoskeletárních struktur meiotického vřeténka

Kromě zrání byl hodnocen také vliv triclosanu v kombinaci s bisphenolem S na utváření meiotického vřeténka. Meiotické vřeténko bylo vizualizováno pomocí imunocytochemické lokalizace α -tubulinu a následně byla na základě mikroskopických snímků hodnocena jeho morfologie. Jako normální byla vyhodnocena bipolární vřeténka se správně napojenými chromozomy seřazenými v ekvatoriální rovině. Mezi nejčastější defekty vřeténka patřilo snížení hustoty tubulinových vláken a výrazné zmenšení vřeténka. S vyšší četností než u oocytů kultivovaných se samotným triclosanem bylo pozorováno špatné napojení chromozomu a neukotvené vlákno tubulinu. Signifikantní negativní vliv triclosanu na utváření meiotického vřeténka byl pozorován u všech tří testovaných koncentrací, jak je patrné z grafu 9.



Graf 9: Vliv triclosanu v kombinaci s bisphenolem S na utváření meiotického vřeténka

Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Data jsou vyobrazena jako průměr \pm střední chyba průměru z 6 nezávislých experimentů, $n \geq 10$ oocytů na skupinu.

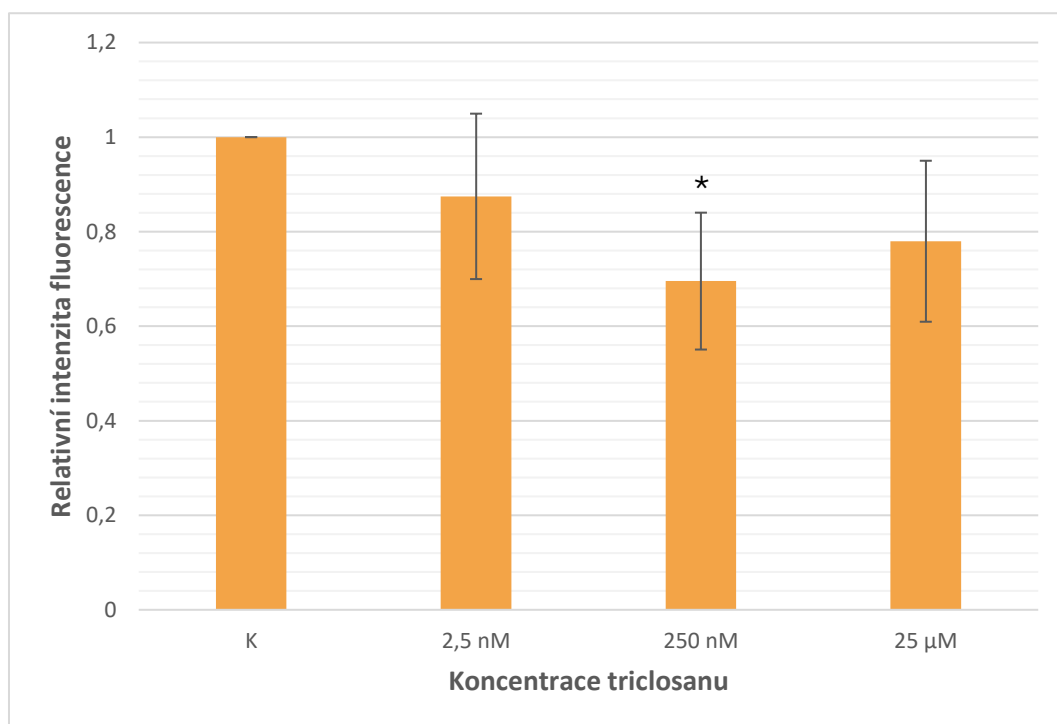


Obrázek 3: Pozorované defekty meiotického vřeténka

Reprezentativní obrázky představují příklady pozorovaných defektů ve skupinách oocytů ošetřených 2,5 nM, 250 nM a 25 μ M triclosanem v kombinaci s 3 pM BPS a kontrolu. α -tubulin je vyobrazen zeleně a chromatin modře. Sloupec merge představuje spojení α -tubulinu a chromatinu. Měřítka uvedené v pravém dolním rohu platí pro všechny obrázky a odpovídá 10 μ m.

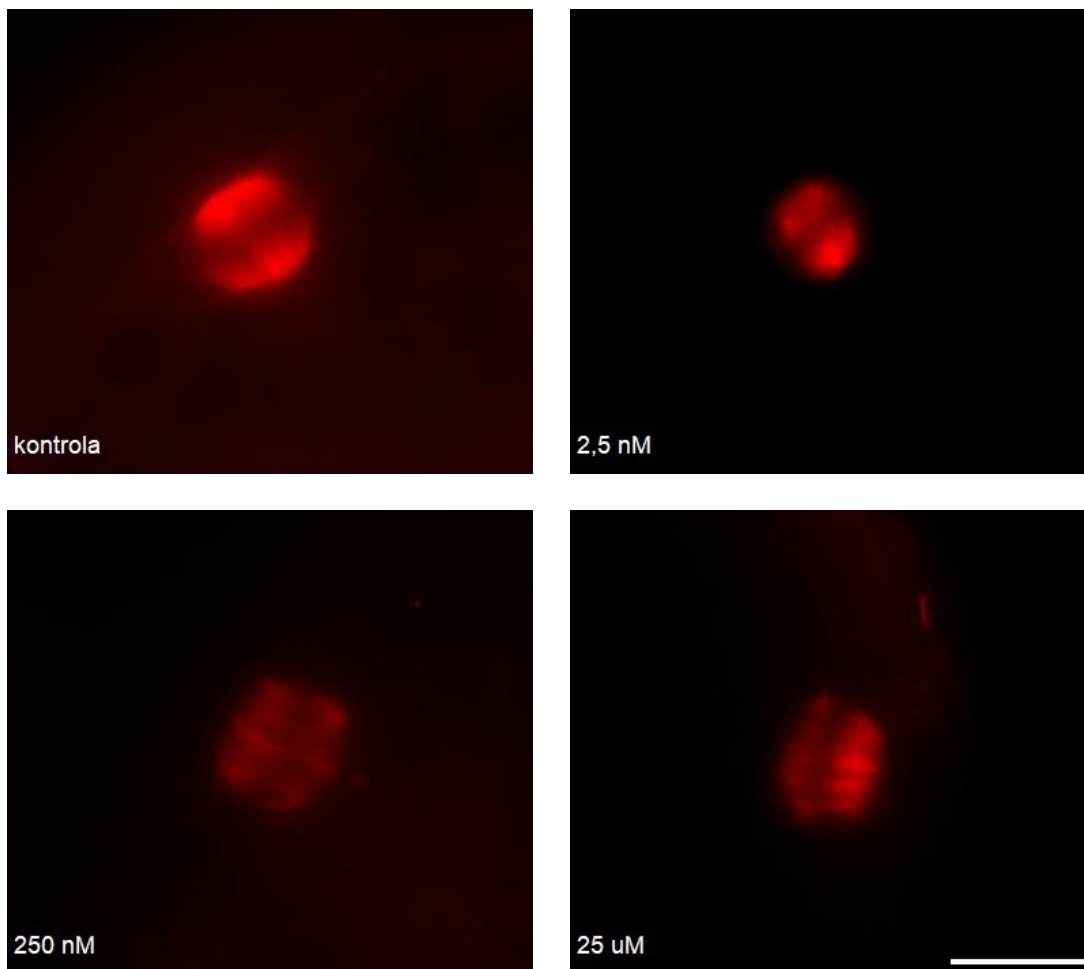
7.8. Vliv triclosanu v kombinaci s 3pM bisphenolem S na acetylaci α -tubulinu a stabilitu mikrotubulů meiotického vřeténka

V posledním experimentu byl sledován vliv triclosanu v koncentracích 2,5 nM, 250 nM a 25 μ M v kombinaci s 3pM BPS na acetylaci α -tubulinu na lysinu 40. U testovaných skupin byla stejně jako v předchozích experimentech hodnocena intenzita fluorescence, která byla následně vztažena ke kontrolní skupině a vyjádřena jako relativní intenzita fluorescence. Z grafu 10 je patrné, že statisticky signifikantní snížení acetylace α -tubulinu bylo pozorováno u skupiny oocytů kultivovaných s 250 nM triclosanem v kombinaci s 3pM BPS.



Graf 10: Vliv triclosanu v kombinaci s 3pM BPS na acetylaci α -tubulinu

Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Data jsou vyobrazena jako průměr \pm střední chyba průměru ze 3 nezávislých experimentů, $n \geq 10$ oocytů na skupinu.



Obrázek 4: Vliv triclosanu v kombinaci s 3 pM BPS na acetylaci α -tubulinu

Reprezentativní snímky zobrazují intenzitu fluorescence acetyl- α -tubulinu ve skupinách oocytů ošetřených 2,5 nM, 250 nM, 25 μ M triclosanem v kombinaci s 3pM BPS ve všech skupinách a kontrolu. Měřítka uvedené v pravém dolním rohu platí pro všechny obrázky a odpovídá 10 μ m.

8. Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu, že triclosan má negativní vliv na meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*. Konkrétně sledovat a zhodnotit vliv této látky na vybrané markery meiotického zrání, jako je utváření meiotického vřetenka, exprese a kvalita mitochondrií a epigenetické markery H3K4me2 a 5mC.

Triclosan je antibakteriální látka využívána komerčně ve velkém množství dezinfekčních a kosmetických přípravků. Jedním z nejobvyklejších produktů obsahujících triclosan jsou antibakteriální mýdla a gely, jejichž komerční spotřeba celosvětově roste. Ovšem studie srovnávající účinky klasického mýdla a mýdla s přídavkem triclosanu ukazují, že přídavek triclosanu v mýdle signifikantně nezvyšuje jeho účinky proti bakteriím (Aiello et al., 2007; Kim et al., 2015). Naopak nadměrná spotřeba triclosanu může přispívat ke zvyšování antibiotické rezistence, která je v současné době ve zdravotnictví stále větší hrozbou (Lu et al., 2018, 2020; Westfall et al., 2019). Z antibakteriálních přípravků se triclosan přímo absorbuje do lidského organismu přes kůži a sliznice. Kromě toho se díky celosvětovému komerčnímu využití množství triclosanu dostává do životního prostředí, kde se vyskytuje zejména v povrchových vodách a půdě. Z prostředí se dále může dostat do pitné vody a potravy (Lindström et al., 2002; Moss et al., 2000; Weatherly & Gosse, 2017; Wu et al., 2009). Triclosan prokazatelně interferuje s lidským organismem. Studie dokazují, že po absorpci se dostává do krve, odkud putuje do dalších tkání. Přítomnost triclosanu byla prokázána kromě krevní plasmy také v mateřském mléce, tukové tkáni, játrech a moči (Allmyr et al., 2006; Calafat et al., 2008; Geens et al., 2012; Sandborgh-Englund et al., 2006).

Na základě literatury a předběžných studií byly pro experimenty zvoleny tři koncentrace triclosanu – 2,5 nM, 250 nM a 25 µM. Naměřené koncentrace v krvi člověka se ve studiích většinou pohybují v jednotkách až desítkách nanomolů (Allmyr et al., 2008; Sandborgh-Englund et al., 2006; Wei et al., 2017). Koncentrace v lidské moči je průměrně vyšší s větším rozptylem od jednotek nanomolů až po desítky mikromolů (Calafat et al., 2008; Etzel et al., 2017; Han et al., 2016). Konkrétně ve folikulární tekutině nebyla zatím koncentrace triclosanu měřena. V játrech byla naměřena koncentrace triclosanu asi 10 nM a v tukové tkáni asi 2 nM. Tyto nezanedbatelné koncentrace v játrech a tukové tkáni podporují spekulace o schopnosti triclosanu akumulace v organismu člověka stejně jako je tomu u ryb a dalších vodních živočichů (Dar et al., 2019; Geens et al., 2012; Shanmugam et al., 2014). V případě akumulace sloučeniny v organismu pak při dlouhodobé expozici dosahují koncentrace v různých orgánech i vyšších hodnot než například v moči a krvi, jako je tomu například u

bisphenolu A, který se akumuluje v lidské placentě a tukové tkáni (Fernandez et al., 2007; Leclerc et al., 2014; Schönfelder et al., 2002).

Triclosan je považován za endokrinní disruptor. Již v letech 2012-2013 se objevuje souhrn poznatků o triclosanu v příručce WHO State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals (Bergman et al., 2013). Od té doby bylo v mnoha studiích dokázáno, že triclosan narušuje fyziologii endokrinního systému hormonů štítné žlázy a HPG osy u savčích modelů i člověka (Cao et al., 2018; Crofton et al., 2007; Li et al., 2017; Wang & Tian, 2015). Na druhé straně se objevují i studie, které jsou s těmito výsledky v rozporu a neprokazují žádný negativní vliv triclosanu na endokrinní systém (Allmyr et al., 2009; Louis et al., 2017; Witorsch, 2014). Tento rozpor může být způsoben tím, že fyziologie endokrinních hormonů je poměrně komplikovaná stejně jako účinek endokrinních disruptorů, které nepodléhají tradičním konceptům v toxikologii. To je jedním z důvodů proč studie založené na podobných principech často přináší velmi odlišné či rozporuplné výsledky (Vandenberg et al., 2012). Každopádně není pochyb, že v současné době celosvětově narůstá počet žen i mužů, kteří mají problémy s reprodukcí a infertilita je v dnešní společnosti poměrně obvyklým onemocněním. K tomu bezpochyby přispívá i množství chemikálií vyskytujících se v životním prostředí, které bezprostředně působí na lidský organismus v každodenním životě a ovlivňují jeho fyziologické funkce (Bala et al., 2021; Ravitsky & Kimmins, 2019; Skakkebaek et al., 2022).

Pro testování účinku triclosanu byly v této práci zvoleny prasečí oocyty. Vzhledem k tomu, že použití lidských oocytů je z etického pohledu velmi složité, prasečí oocyty se nabízí jako vhodná alternativa pro základní výzkum. Prasečí a lidský organismus sdílí řadu podobností zejména ve fyziologii i v samotné oogenezi. Prasečí oocyt je v mnoha ohledech velmi podobný lidskému, více než například oocyt myši, který je ve výzkumech aplikovaných na člověka obvyklým modelem. Podobnost je kromě velikosti oocytu také v délce meiotického zrání, dále v časování rýhování embrya, dosažení stadia blastocysty, uhníždění embrya v děloze nebo aktivaci embryonálního genomu (Lunney et al., 2021; Magnusson, 2005; Mordhorst & Prather, 2017; Santos et al., 2014). Argumentem pro využití prasečích oocytů jakožto odpadního materiálu z jatek je také snížení počtu laboratorních zvířat.

V prvním experimentu byl prokázán negativní efekt všech tří testovaných koncentrací na meiotickou maturaci prasečích oocytů *in vitro*. Jedná se o lineární efekt a triclosan tak v koncentracích 2,5 nM, 250 nM a 25 µM snižuje schopnost oocytu dosáhnout po 48 hodinách stadia MII (Graf 1). Jak je patrné z výsledků, významné procento oocytů ošetřených triclosanem je schopno vystoupit z I. meiotického bloku, ale není dále schopno

dokončit meiotické zrání až do stadia MII. Srovnatelný výsledek byl také pozorován u doposud jediné studie zabývající se vlivem triclosanu na meiotické zrání oocytů. Park et al., 2020 potvrzují negativní efekt triclosanu 10 μ M a 100 μ M na meiotickou maturaci a expanzi kumulárních buněk. Kromě toho je možné srovnávat vliv triclosanu s dalšími endokrinními disruptory, jako jsou například bisphenoly A a S, které mají podobnou strukturu a očekáváme jejich častý společný výskyt v prostředí (Geens et al., 2015; Kim et al., 2011). U bisphenolu A bylo pozorováno narušení meiotické maturace prasečích oocytů, narušení expanze kumulárních buněk a vyloučení 1. pólového tělíska. Stejně jako u triclosanu je narušena zejména schopnost oocytu dozrát do stadia MII (Mlynářčíková et al., 2009; Wang et al., 2016). Podobné efekty byly po expozici BPA pozorovány u lidských oocytů (Machtinger et al., 2013). U bisphenolu S byly v naší laboratoři popsány analogické negativní efekty. Prasečí oocyty byly schopny zahájit meiotickou maturaci, ale progresi do stadia MII byla výrazně narušena (Žalmanová et al., 2017, 2023).

Jednou z hypotéz, proč by triclosan mohl narušovat meiotické zrání, je narušení funkce a struktury meiotického vřeténka. Tento jev byl pozorován již při kultivaci oocytů s jinými ED, zejména s bisphenoly (Campen et al., 2018; Machtinger et al., 2013; Nevoral et al., 2021). Rozhodli jsme se proto zaměřit na utváření meiotického vřeténka ve druhém experimentu. Kromě mikrotubulů přispívá k dynamice meiotického vřeténka také aktinový cytoskelet, a tak by zastavení progresi meiotickou maturací mohla způsobit interakce triclosanu s aktinem nebo s aktin nukleujícími faktory. Narušení mikrofilament bylo dříve pozorováno u oocytů kultivovaných s bisphenoly. V těchto studiích má vystavení bisphenolům za následek narušení cytokineze a vyloučení 1. pólového tělíska (Wang et al., 2016; Zhang et al., 2020). Není možné opomenout také deregulaci MAPK pozorovanou skupinami Wang et al., 2016; Zhang et al., 2020 ve studiích vlivu bisphenolů na meiotické zrání oocytů. MAPK signální dráha je zapojena do výstupu z I. meiotického bloku, sestavení meiotického vřeténka a přechodu do II. meiotického dělení, a proto narušení této dráhy má za následek narušení meiotické maturace (Fan et al., 2002).

Cílem druhého experimentu bylo vyhodnotit vliv triclosanu na utváření meiotického vřeténka. Jelikož správná organizace a sestavení bipolárního meiotického vřeténka jsou klíčové pro meiotickou maturaci a správnou segregaci chromozomů. Nesprávné sestavení meiotického vřeténka je často důvodem pro narušení průběhu meiotického zrání a abnormální segregaci chromozomů. Výsledkem mohou být aneuploidie nebo poškození DNA oocytů a následné defekty embryonálního vývoje (Holubcová et al., 2015; Namgoong & Kim, 2018; Thomas et al., 2021). V tomto experimentu bylo potvrzeno, že všechny tři testované

koncentrace triclosanu mají negativní vliv na utváření meiotického vřeténka (Graf 2). Nejčastějšími defekty abnormálních meiotických vřetének bylo narušení struktury a snížení hustoty tubulinových vláken nebo obecně výrazné zmenšení celého vřeténka. Dále bylo s menší četností pozorováno neukotvené vlákno tubulinu, chybné napojení chromozomu a monopolární či tripolární uspořádání meiotického vřeténka (Obrázek 2). Defekty v utváření meiotického vřeténka byly pozorovány také ve studiích vlivu bisphenolů na oocyty. Častým defektem je narušení morfologie a bipolarity meiotického vřeténka, špatné uspořádání chromozomů a poškození tubulinových vláken (Campen et al., 2018; Wang et al., 2016; Zhang et al., 2020; Žalmanová et al., 2023). Podle Hunt et al., 2003 vystavení oocytů BPA způsobuje zvýšenou incidenci aneuploidií. Stejně tak pesticid methoxychlor, který je stejně jako triclosan chlorovaným bisphenolem způsobuje narušení mikrotubulů a vznik multipolárního meiotického vřeténka (Liu et al., 2016).

Způsobů, kterými by triclosan mohl negativně ovlivňovat meiotické vřeténko, je hned několik. Triclosan by mohl stejně jako bisphenoly přímo vázat na mikrotubuly a proteiny MTOC a ovlivňovat tak jejich nukleaci a organizaci v rámci utváření meiotického vřeténka (George et al., 2008; Yang et al., 2020). Tento způsob interakce zatím v souvislosti s triclosanem nebyl na savčích oocytech studován. Studie Weatherly et al., 2018 na somatických buňkách ovšem tuto interakci nepotvrdila.

Funkce mikrotubulů může být narušena také narušením posttranslačních modifikací, které klíčovým způsobem ovlivňují a regulují funkci a dynamiku mikrotubulů (Wloga & Gaertig, 2010). Jednou z obvyklých modifikací je acetylace α -tubulinu na lysinu 40. Tato acetylace stabilizuje mikrotubuly a její správná hladina je důležitá také pro stabilitu meiotického vřeténka zejména v metafázní rovině pro kontakt s kinetochorem (Serra et al., 2018). Po vystavení oocytů bisphenolům B a F byla pozorována signifikantně vyšší úroveň acetylace α -tubulinu na lysinu 40 a tento jev by mohl být pozorován i u triclosanu (Ding et al., 2022; Zhang et al., 2020). Na základě těchto poznatků jsme se rozhodli kromě struktury meiotického vřeténka vyhodnotit také úroveň acetylace α -tubulinu a pozorovat změny této posttranslační modifikace způsobené kultivací oocytů s triclosanem. Podle našich výsledků byla acetylace α -tubulinu na lysinu 40 zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou pouze u kultivace s triclosanem o koncentraci 25 μ M. U skupin oocytů kultivovaných s 2,5 nM a 250 nM triclosanem byla acetylace naopak oproti kontrole snížena (Graf 3). Žádný z dosažených výsledků ovšem nebyl statisticky signifikantní, a proto nemůžeme prokázat, že triclosan má negativní vliv na hladinu acetylace α -tubulinu na lysinu 40 stejně jako zmíněné bisphenoly B a F.

Důvodem by mohlo být také narušení funkce MAPK, která je jednou z kináz přispívající k regulaci sestavení vřeténka. V normálním vřeténku MAPK asociuje s dalšími proteiny MTOC a reguluje tvorbu bipolárního meiotického vřeténka (Fan & Sun, 2004). Vlivem bisphenolů dochází ke snížení fosforylace MAPK a její delokalizaci z MTOC, což vede k defektům vřeténka (Ding et al., 2017; Wang et al., 2016; Zhang et al., 2020). Tento efekt byl pozorován také u studie zkoumající vliv triclocarbanu, sloučeniny strukturně podobné triclosanu, na myších oocytech *in vitro* (Ding et al., 2020). Kromě MAPK mohou být deregulovány také další proteiny asociované s meiotickým vřeténkem jako kineziny, Aurora A nebo TPX2, což by stejně jako u bisphenolů mělo za následek destabilizaci meiotického vřeténka (Loup et al., 2022; Yang et al., 2020). Možností poškození meiotického vřeténka triclosanem je tedy hned několik a pravděpodobně se může jednat o kumulaci více efektů. Každopádně se domníváme, že tyto výsledky otevírají další možnosti a směry výzkumu vlivu triclosanu na meiotické zrání oocytů.

Cílem čtvrtého experimentu bylo zhodnotit vliv triclosanu na expresi a kvalitu mitochondrií v rámci meiotické maturace prasečích oocytů *in vitro*. Mitochondrie jsou klíčovou organelou pro meiotické zrání, které je velmi energeticky náročným procesem. Kromě toho se kvalita mitochondrií oocyty přímo odráží na kvalitě embryonálních mitochondrií díky maternální dědičnosti těchto organel (Ge et al., 2012). V první části experimentu byly nejprve mitochondrie imunocytochemicky vizualizovány pro měření exprese a porovnání mezi jednotlivými testovanými skupinami. Poté byl imunocytochemicky vizualizován mitochondriální enzym SIRT3, jehož hladina poukazuje na kvalitu, metabolismus a míru oxidativního poškození mitochondrií. Jak je patrné z grafů 4 a 5, nejvýraznější změny mitochondrií bylo možné pozorovat u oocytů kultivovaných s 2,5 nM triclosanem. Tyto změny ale nejsou oproti kontrole a ostatním testovaným skupinám statisticky signifikantní. Podle našich výsledků tedy předpokládáme, že triclosan nemá negativní vliv na expresi a kvalitu mitochondrií během meiotické maturace. Náš výsledek je ovšem v rozporu s několika studiemi vlivu triclosanu na savčí somatické buňky a spermie. Podle těchto studií triclosan narušuje oxidativní fosforylaci, což vede ke snížené produkci ATP a zvýšené produkci ROS, které mitochondrie dále poškozují (Ajao et al., 2015; Kosińska & Szychowski, 2024; Teplova et al., 2017). Oocyty jsou ovšem vysoce specializované buňky a účinek triclosanu tedy nemusí být plně srovnatelný se somatickými buňkami. Dosud jediná studie zabývající se vlivem triclosanu na meiotickou maturaci oocytů od skupiny Park et al., 2020 prezentuje negativní vliv této látky na oxidativní stres a zvýšenou expresi mitochondriálních proapoptotických markerů. Většina signifikantních výsledků byla ovšem

dosažena po expozici oocytů 100 μ M triclosanem. To je, jak sami autoři uvádí, poměrně vysoká koncentrace, která nereprezentuje obvyklou expozici. Rozdílné výsledky tak mohly být způsobeny jinými experimentálními podmínkami. Nabízí se také možnost porovnání se studii vlivu bisphenolů na mitochondrie oocytů. Ty se ale zabývají převážně změnami lokalizace mitochondrií v rámci meiotické maturace a zaměřují se tak na jiné aspekty této problematiky (Pan et al., 2021; Žalmanová et al., 2023).

Bylo prokázáno, že ED působí na buňky také epigenetickou cestou a ovlivňují tak DNA metylaci a modifikace histonů (Alavian-Ghavanini & Rüegg, 2018). Proto měl pátý experiment za cíl sledovat a zhodnotit vliv triclosanu na epigenetické modifikace 5mC a H3K4me2. Tyto epigenetické markery byly imunocytochemicky vizualizovány a poté byla měřena intenzita fluorescence a porovnávány rozdíly mezi jednotlivými experimentálními koncentracemi. Hladiny methylace DNA i histonu H3 byly u všech experimentálních skupin vyšší než u skupiny kontrolní. U obou epigenetických modifikací byl největší rozdíl zaznamenán při kultivaci oocytů s 250 nM triclosanem. Tyto pozorované změny ovšem nebyly statisticky signifikantní (Graf 6 a 7). Tato práce je zatím jediná, která se zabývá sledováním vlivu triclosanu na tyto epigenetické markery v souvislosti s meiotickým zráním oocytů. Methylocí H3K4me2 a 5mC se zabývá studie vlivu BPA na meiotickou maturaci prasečích oocytů skupiny Wang et al., 2016. Zde byla pozorována snížená hladina H3K4me2 a 5mC v porovnání s kontrolní skupinou a byl prokázán negativní vliv BPA na tyto epigenetické markery. Snížená methylace DNA a snížená exprese oocytárních DNA methyltransferáz byla pozorovány také u myších oocytů vystavených vlivu BPA (Chao et al., 2012). Vzhledem k tomu, že methylace histonu H3 na lysinu 4 je spojována s aktivní transkripcí, narušení správné hladiny této modifikace může vést ke snížené kvalitě oocytu a případnému narušení transkripce v raném embryu (Bilmez et al., 2022; Mei et al., 2023). Stejně tak 5mC je klíčovou modifikací zejména pro methylační vzorec embrya a imprinting (Sendžikaitė & Kelsey, 2019). Výsledky této práce jsou v porovnání se studii vlivu BPA na epigenetické markery oocytů rozporuplné. Vzhledem k malému množství publikací zaměřených na vliv ED na metylaci DNA a histonů oocytů je proto potřeba podpořit tento směr výzkumu dalšími studii.

Jak již bylo zmíněno, některé reprodukčně toxické látky se v prostředí často vyskytují společně. Proto se domníváme, že studie zahrnující do svých experimentů více reprodukčně toxických látek najednou by mohly být cestou, jak ještě lépe simulovat jejich reálný výskyt v prostředí a reálnou expozici živočichů včetně člověka. Rozhodli jsme se proto otestovat vliv triclosanu v kombinaci s BPS na meiotickou maturaci oocytů. Pro tyto experimenty byl

zvolen BPS v experimentální koncentraci 3 pM. Při této koncentraci nebyly v naší laboratoři prokázány žádné negativní vlivy BPS na meiotické zrání prasečích oocytů, utváření meiotického vřeténka ani změny v acetylaci α -tubulinu. Získané výsledky tedy odpovídají efektu kombinace endokrinních disruptorů.

V prvním experimentu s kombinacemi ED jsme se zaměřili opět na meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*. V tomto experimentu kombinace triclosanu a BPS negativně ovlivňuje meiotickou maturaci v experimentálních skupinách s koncentracemi triclosanu 2,5 nM a 250 nM. Můžeme tedy pozorovat nelineární závislost meiotické maturace na dávce kombinace ED. Zároveň se zde projevuje také efekt nízké dávky, kdy nižší koncentrace ED mají silnější účinek než koncentrace vyšší (Graf 8). Tento výsledek se liší od výsledků meiotické maturace při kultivaci oocytů pouze s triclosanem. Je tedy patrné, že ED mohou vzájemně modifikovat své účinky na meiotickou maturaci oocytů.

Dalším cílem bylo sledovat a zhodnotit utváření meiotického vřeténka při kultivaci oocytů s kombinací triclosanu a BPS. I v tomto experimentu byl prokázán negativní efekt všech tří testovaných koncentrací triclosanu v kombinaci s 3pM BPS na utváření meiotického vřeténka. Na rozdíl od kultivace se samotným triclosanem, kde bylo patrné největší procento abnormálních vřetének u koncentrace triclosanu 25 μ M, vykazují při kultivaci s kombinací ED všechny tři testované skupiny podobný poměr normálních a abnormálních meiotických vřetének (Graf 9). Nejobvyklejšími defekty meiotického vřeténka bylo narušení struktury a snížení hustoty tubulinových vláken nebo zmenšení celého vřeténka. S větší četností než u kultivace se samotným triclosanem bylo pozorováno neukotvené vlákno tubulinu a chybné napojení chromozomu (Obrázek 3). Porušení bipolarity meiotického vřeténka bylo pozorováno u jednotek oocytů.

Zaměřili jsme se také na vliv kombinace triclosanu a BPS na acetylaci α -tubulinu na lysinu 40, která, jak již bylo zmíněno, úzce souvisí se stabilitou meiotického vřeténka. Při kultivaci s kombinací ED byla na rozdíl od kultivace se samotným triclosanem hladina acetylace u všech tří testovaných skupin snížena oproti kontrole. Signifikantně nižší hladina acetylace α -tubulinu byla pozorována u skupiny oocytů ošetřených 250 nM triclosanem v kombinaci s 3 pM bisphenolem (Graf 10, Obrázek 4). To je rozdílný výsledek oproti samotnému triclosanu, kde v žádné z testovaných skupin nebyl potvrzen negativní vliv na acetyl- α -tubulin.

Jak je patrné z prezentovaných výsledků, efekty kombinace více ED jsou často v mnohých aspektech rozdílné oproti vlivu samotné reprodukčně toxické látky. Experimenty s kombinacemi ED jsou ale podstatně komplikovanější zejména v oblasti interpretace

výsledků, a proto se publikace častěji zabývají efekty ED samostatně. Pro studium efektů kombinace ED je také bezpochyby nejdříve potřeba detailně prostudovat efekty samotných ED (Sharma et al., 2017). I přes tyto možné komplikace se domníváme, že studie efektu kombinací ED by mohly být v budoucnosti cestou, jak ještě lépe simulovat reálnou expozici člověka reprodukčně toxickým látkám a s ní související zdravotní rizika.

9. Závěr

Tato diplomová práce je první, která testuje hypotézu negativního vlivu triclosanu na průběh meiotického zrání prasečích oocytů *in vitro*. V prvním experimentu byl prokázán negativní vliv triclosanu na průběh meiotického zrání prasečích oocytů a jejich schopnost dozrát do stadia MII. Signifikantně snížená schopnost dozrát do stadia MII byla prokázána ve všech testovaných skupinách. Ve druhém experimentu byl sledován a prokázán negativní vliv všech testovaných koncentrací triclosanu na utváření struktury meiotického vřeténka. V souvislosti se sledovanými abnormalitami meiotického vřeténka byla hodnocena hladina acetyl- α -tubulinu, ale signifikantní změna hladiny acetylace nebyla prokázána. Ve čtvrtém experimentu byl hodnocen vliv triclosanu na expresi a kvalitu mitochondrií. V tomto experimentu nebyl prokázán negativní vliv této látky na mitochondrie. Stejně tak se nepotvrdil vliv triclosanu na epigenetické markery H3K4me2 a 5mC.

Ve druhé části se diplomová práce zaměřila na vliv triclosanu v kombinaci s BPS na meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*. Zde byl prokázán vliv této kombinace ED na meiotické zrání a schopnost oocytů dozrát do stadia MII v experimentálních skupinách 2,5 nM a 250 nM. Ve všech testovaných skupinách byl prokázán negativní vliv kombinace ED na utváření meiotického vřeténka. Negativní vliv triclosanu s BPS byl potvrzen také při vyhodnocení změn hladiny acetyl- α -tubulinu.

K objasnění přesných mechanismů působení triclosanu bude potřeba dalších studií. Každopádně tato práce přináší nové směry a možnosti výzkumu vlivu triclosanu na reprodukční soustavu a poukazuje na potenciální zdravotní rizika komerčního využití triclosanu a dalších endokrinních disruptorů.

10. Zdroje citované literatury

- Ackert, C. L., Gittens, J. E. I., O'Brien, M. J., Eppig, J. J., & Kidder, G. M. (2001). Intercellular Communication via Connexin43 Gap Junctions Is Required for Ovarian Folliculogenesis in the Mouse. *Developmental Biology*, 233(2), 258–270. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0216>
- Adhikari, A., Das, B. K., Ganguly, S., Nag, S. K., Sadhukhan, D., & Raut, S. S. (2023). Emerging contaminant triclosan incites endocrine disruption, reproductive impairments and oxidative stress in the commercially important carp, Catla (*Labeo catla*): An insight through molecular, histopathological and bioinformatic approach. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 268, 109605. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109605>
- Adhikari, D., & Liu, K. (2014). The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.07.027>
- Adhikari, D., Zheng, W., Shen, Y., Gorre, N., Ning, Y., Halet, G., Kaldis, P., & Liu, K. (2012). Cdk1, but not Cdk2, is the sole Cdk that is essential and sufficient to drive resumption of meiosis in mouse oocytes. *Human Molecular Genetics*, 21(11), 2476–2484. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds061>
- Adolfsson-Erici, M., Pettersson, M., Parkkonen, J., & Sturve, J. (2002). Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere*, 46(9–10), 1485–1489. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00255-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00255-7)
- Ahmed, I., Boulton, A. J., Rizvi, S., Carlos, W., Dickenson, E., Smith, N., & Reed, M. (2019). The use of triclosan-coated sutures to prevent surgical site infections: A systematic review and meta-analysis of the literature. *BMJ Open*, 9(9), e029727. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-029727>
- Ahsan, N., Ullah, H., Ullah, W., & Jahan, S. (2018). Comparative effects of Bisphenol S and Bisphenol A on the development of female reproductive system in rats; a neonatal exposure study. *Chemosphere*, 197, 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.118>
- Aiello, A. E., Larson, E. L., & Levy, S. B. (2007). Consumer Antibacterial Soaps: Effective or Just Risky? *Clinical Infectious Diseases*, 45(Supplement_2), S137–S147. <https://doi.org/10.1086/519255>
- Ajao, C., Andersson, M. A., Teplova, V. V., Nagy, S., Gahmberg, C. G., Andersson, L. C., Hautaniemi, M., Kakasi, B., Roivainen, M., & Salkinoja-Salonen, M. (2015). Mitochondrial toxicity of triclosan on mammalian cells. *Toxicology Reports*, 2, 624–637. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.03.012>

- Alam, M. H., & Miyano, T. (2020). Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. *Reproductive Medicine and Biology*, *19*(1), 13–23. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12292>
- Alavian-Ghavanini, A., & Rüegg, J. (2018). Understanding Epigenetic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals: From Mechanisms to Novel Test Methods. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *122*(1), 38–45. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12878>
- Allmyr, M., Adolfsson-Erici, M., McLachlan, M. S., & Sandborgh-Englund, G. (2006). Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products. *Science of The Total Environment*, *372*(1), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.08.007>
- Allmyr, M., Harden, F., Toms, L.-M. L., Mueller, J. F., McLachlan, M. S., Adolfsson-Erici, M., & Sandborgh-Englund, G. (2008). The influence of age and gender on triclosan concentrations in Australian human blood serum. *Science of The Total Environment*, *393*(1), 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.12.006>
- Allmyr, M., Panagiotidis, G., Sparve, E., Diczfalusy, U., & Sandborgh-Englund, G. (2009). Human Exposure to Triclosan via Toothpaste does not change CYP3A4 Activity or Plasma Concentrations of Thyroid Hormones. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *105*(5), 339–344. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00455.x>
- Anderson, R., Copeland, T. K., Schöler, H., Heasman, J., & Wylie, C. (2000). The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mechanisms of Development*, *91*(1–2), 61–68. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00271-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00271-3)
- Aoshima, K., Inoue, E., Sawa, H., & Okada, Y. (2015). Paternal H3K4 methylation is required for minor zygotic gene activation and early mouse embryonic development. *EMBO Reports*, *16*(7), 803–812. <https://doi.org/10.15252/embr.201439700>
- Ara, T., Nakamura, Y., Egawa, T., Sugiyama, T., Abe, K., Kishimoto, T., Matsui, Y., & Nagasawa, T. (2003). Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(9), 5319–5323. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730719100>
- Aranami, K., & Readman, J. W. (2007). Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater. *Chemosphere*, *66*(6), 1052–1056. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.010>
- Armenti, A. E., Zama, A. M., Passantino, L., & Uzumcu, M. (2008). Developmental methoxychlor exposure affects multiple reproductive parameters and ovarian folliculogenesis and gene expression in adult rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *233*(2), 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.09.010>
- Bachvarova, R. F. (1992). A maternal tail of poly(a): The long and the short of it. *Cell*, *69*(6), 895–897. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90606-D](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90606-D)

- Baker, T. G. (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. <https://doi.org/10.1098/rspb.1963.0055>
- Bala, R., Singh, V., Rajender, S., & Singh, K. (2021). Environment, Lifestyle, and Female Infertility. *Reproductive Sciences*, 28(3), 617–638. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00279-3>
- Balmer, M. E., Poiger, T., Droz, C., Romanin, K., Bergqvist, P.-A., Müller, M. D., & Buser, H.-R. (2004). Occurrence of Methyl Triclosan, a Transformation Product of the Bactericide Triclosan, in Fish from Various Lakes in Switzerland. *Environmental Science & Technology*, 38(2), 390–395. <https://doi.org/10.1021/es030068p>
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., & Zhao, K. (2007). High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell*, 129(4), 823–837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>
- Basavarajappa, M. S., Craig, Z. R., Hernández-Ochoa, I., Paulose, T., Leslie, T. C., & Flaws, J. A. (2011). Methoxychlor reduces estradiol levels by altering steroidogenesis and metabolism in mouse antral follicles in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 253(3), 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.04.007>
- Basini, G., Grasselli, F., Quintavalla, F., Bussolati, S., Andreoli, V., Carrillo Heredero, A. M., & Bertini, S. (2022). Redox Status, Estrogen and Progesterone Production by Swine Granulosa Cells Are Impaired by Triclosan. *Animals*, 12(24), 3559. <https://doi.org/10.3390/ani12243559>
- Baumann, C. T., Lim, C. S., & Hager, G. L. (1999). Intracellular localization and trafficking of steroid receptors. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 31(2), 119–127. <https://doi.org/10.1007/BF02738167>
- Beato, M., Candau, R., Chávez, S., Möws, C., & Truss, M. (1996). Interaction of steroid hormone receptors with transcription factors involves chromatin remodelling. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 56(1–6), 47–59. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(95\)00223-5](https://doi.org/10.1016/0960-0760(95)00223-5)
- Bedoux, G., Roig, B., Thomas, O., Dupont, V., & Le Bot, B. (2012). Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(4), 1044–1065. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0632-z>
- Bendel-Stenzel, M. R., Gomperts, M., Anderson, R., Heasman, J., & Wylie, C. (2000). The role of cadherins during primordial germ cell migration and early gonad formation in the mouse. *Mechanisms of Development*, 91(1–2), 143–152. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00287-7](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00287-7)
- Bennabi, I., Terret, M.-E., & Verlhac, M.-H. (2016). Meiotic spindle assembly and chromosome segregation in oocytes. *Journal of Cell Biology*, 215(5), 611–619. <https://doi.org/10.1083/jcb.201607062>
- Bergman, Å., Heindel, J. J., Jobling, S., Kidd, K. A., & Zoeller, R. T. (2013). *State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012: An assessment of the state of the*

science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and WHO. United National Environment Programme : World Health Organization.

- Bhagawati, M., Arroum, T., Webeling, N., Montoro, A. G., Mootz, H. D., & Busch, K. B. (2021). The receptor subunit Tom20 is dynamically associated with the TOM complex in mitochondria of human cells. *Molecular Biology of the Cell*, 32(20), br1. <https://doi.org/10.1091/mbc.E21-01-0042>
- Bhardwaj, J. K. (2014). Influence of Toxic Chemicals on Female Reproduction: A Review. *Cell Biology: Research & Therapy*, 03(01). <https://doi.org/10.4172/2324-9293.1000110>
- Bhatt, R. R., & Ferrell, J. E. (1999). The Protein Kinase p90 Rsk as an Essential Mediator of Cytostatic Factor Activity. *Science*, 286(5443), 1362–1365. <https://doi.org/10.1126/science.286.5443.1362>
- Bieleńska-Osuchowska, Z. (2006). Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: Ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology*, 6(2), 161–193.
- Bilmez, Y., Talibova, G., & Ozturk, S. (2022). Dynamic changes of histone methylation in mammalian oocytes and early embryos. *Histochemistry and Cell Biology*, 157(1), 7–25. <https://doi.org/10.1007/s00418-021-02036-2>
- Bjerregaard, B. (2003). Regulation of Ribosomal RNA Synthesis During the Final Phases of Porcine Oocyte Growth. *Biology of Reproduction*, 70(4), 925–935. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.020941>
- Black, J. C., Van Rechem, C., & Whetstine, J. R. (2012). Histone Lysine Methylation Dynamics: Establishment, Regulation, and Biological Impact. *Molecular Cell*, 48(4), 491–507. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.006>
- Black, J. L., & Erickson, B. H. (1968). Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Record*, 161(1), 45–55. <https://doi.org/10.1002/ar.1091610105>
- Bleil, J. D., Beall, C. F., & Wassarman, P. M. (1981). Mammalian sperm-egg interaction: Fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. *Developmental Biology*, 86(1), 189–197. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90329-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90329-8)
- Bornslaeger, E. A., Mattei, P., & Schultz, R. M. (1986). Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Developmental Biology*, 114(2), 453–462. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(86\)90209-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(86)90209-5)
- Borum, K. (1961). Oogenesis in the mouse. *Experimental Cell Research*, 24(3), 495–507. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90449-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90449-9)
- Burgess, A., Vigneron, S., Brioude, E., Labbé, J.-C., Lorca, T., & Castro, A. (2010). Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation

- of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(28), 12564–12569. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914191107>
- 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. <https://doi.org/10.1289/ehp.10768>
- 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*, *33*(5), 895–904. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey050>
- Cao, X.-Y., Hua, X., Xiong, J.-W., Zhu, W.-T., Zhang, J., & Chen, L. (2018). Impact of Triclosan on Female Reproduction through Reducing Thyroid Hormones to Suppress Hypothalamic Kisspeptin Neurons in Mice. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*, 6. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00006>
- Carabatsos, M. J., Combelles, C. M. H., Messinger, S. M., & Albertini, D. F. (2000). Sorting and reorganization of centrosomes during oocyte maturation in the mouse. *Microscopy Research and Technique*, *49*(5), 435–444. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(20000601\)49:5<435::AID-JEMT5>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(20000601)49:5<435::AID-JEMT5>3.0.CO;2-H)
- Carabatsos, M. J., Sellitto, C., Goodenough, D. A., & Albertini, D. F. (2000). Oocyte–Granulosa Cell Heterologous Gap Junctions Are Required for the Coordination of Nuclear and Cytoplasmic Meiotic Competence. *Developmental Biology*, *226*(2), 167–179. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9863>
- Ciusa, M. L., Furi, L., Knight, D., Decorosi, F., Fondi, M., Raggi, C., Coelho, J. R., Aragonés, L., Moce, L., Visa, P., Freitas, A. T., Baldassarri, L., Fani, R., Viti, C., Orefici, G., Martínez, J. L., Morrissey, I., & Oggioni, M. R. (2012). A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *40*(3), 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.04.021>
- Clarke, P. R., & Zhang, C. (2008). Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(6), 464–477. <https://doi.org/10.1038/nrm2410>
- Clift, D., & Schuh, M. (2015). A three-step MTOC fragmentation mechanism facilitates bipolar spindle assembly in mouse oocytes. *Nature Communications*, *6*(1), 7217. <https://doi.org/10.1038/ncomms8217>
- Collins, J. K., Lane, S. I. R., Merriman, J. A., & Jones, K. T. (2015). DNA damage induces a meiotic arrest in mouse oocytes mediated by the spindle assembly checkpoint. *Nature Communications*, *6*(1), 8553. <https://doi.org/10.1038/ncomms9553>
- Combarrous, Y., & Nguyen, T. M. D. (2019). Comparative Overview of the Mechanisms of Action of Hormones and Endocrine Disruptor Compounds. *Toxics*, *7*(1), 5. <https://doi.org/10.3390/toxics7010005>

- Connors, S. A., Kanatsu-Shinohara, M., Schultz, R. M., & Kopf, G. S. (1998). Involvement of the Cytoskeleton in the Movement of Cortical Granules during Oocyte Maturation, and Cortical Granule Anchoring in Mouse Eggs. *Developmental Biology*, 200(1), 103–115. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.8945>
- Conti, M., Andersen, C. B., Richard, F. J., Shitsukawa, K., & Tsafiriri, A. (1998). Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145(1–2), 9–14. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00187-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00187-7)
- Cree, L. M., Samuels, D. C., De Sousa Lopes, S. C., Rajasimha, H. K., Wonnapijit, P., Mann, J. R., Dahl, H.-H. M., & Chinnery, P. F. (2008). A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nature Genetics*, 40(2), 249–254. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.63>
- Crofton, K. M., Paul, K. B., DeVito, M. J., & Hedge, J. M. (2007). Short-term in vivo exposure to the water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24(2), 194–197. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.04.008>
- Da Silva-Buttkus, P., Jayasooriya, G. S., Mora, J. M., Mobberley, M., Ryder, T. A., Baithun, M., Stark, J., Franks, S., & Hardy, K. (2008). Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. *Journal of Cell Science*, 121(23), 3890–3900. <https://doi.org/10.1242/jcs.036400>
- Dalton, C. M., & Carroll, J. (2013). Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. *Journal of Cell Science*, jcs.128744. <https://doi.org/10.1242/jcs.128744>
- Danzl, E., Sei, K., Soda, S., Ike, M., & Fujita, M. (2009). Biodegradation of Bisphenol A, Bisphenol F and Bisphenol S in Seawater. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(4), 1472–1484. <https://doi.org/10.3390/ijerph6041472>
- Dar, O. I., Sharma, S., Singh, K., & Kaur, A. (2019). Teratogenicity and accumulation of triclosan in the early life stages of four food fish during the bioassay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 176, 346–354. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.102>
- Das Sarkar, S., Nag, S. K., Kumari, K., Saha, K., Bandyopadhyay, S., Aftabuddin, M., & Das, B. K. (2020). Occurrence and Safety Evaluation of Antimicrobial Compounds Triclosan and Triclocarban in Water and Fishes of the Multitrophic Niche of River Torsa, India. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 79(4), 488–499. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00785-0>
- Davis, J. S., & LaVoie, H. A. (2019). Molecular Regulation of Progesterone Production in the Corpus Luteum. In *The Ovary* (s. 237–253). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813209-8.00015-7>

- De Felici, M. (2016). The Formation and Migration of Primordial Germ Cells in Mouse and Man. In R. P. Piprek (Ed.), *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development* (Roč. 58, s. 23–46). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5_2
- Delgado, D., Sosnik, A., & Martínez, F. (2011). Transfer Thermodynamics of Triclosan from Water to Organic Solvents with Different Hydrogen Bonding Capability. *Latin American Journal of Pharmacy*, 30, 459–466.
- Dhillon, G., Kaur, S., Pulicharla, R., Brar, S., Cledón, M., Verma, M., & Surampalli, R. (2015). Triclosan: Current Status, Occurrence, Environmental Risks and Bioaccumulation Potential. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(5), 5657–5684. <https://doi.org/10.3390/ijerph120505657>
- Di Renzo, G. C., Conry, J. A., Blake, J., DeFrancesco, M. S., DeNicola, N., Martin, J. N., McCue, K. A., Richmond, D., Shah, A., Sutton, P., Woodruff, T. J., Van Der Poel, S. Z., & Giudice, L. C. (2015). International Federation of Gynecology and Obstetrics opinion on reproductive health impacts of exposure to toxic environmental chemicals. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 131(3), 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.09.002>
- Diaz, F. J., Wigglesworth, K., & Eppig, J. J. (2007). Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *Journal of Cell Science*, 120(8), 1330–1340. <https://doi.org/10.1242/jcs.000968>
- Ding, Z., Chen, Y., Ahmad, M. J., Wang, Y., Yang, S., Duan, Z., Liu, M., Yang, C., Liang, A., Hua, G., & Huo, L. (2022). Bisphenol F exposure affects mouse oocyte in vitro maturation through inducing oxidative stress and DNA damage. *Environmental Toxicology*, 37(6), 1413–1422. <https://doi.org/10.1002/tox.23494>
- Ding, Z.-M., Ahmad, M. J., Meng, F., Chen, F., Wang, Y.-S., Zhao, X.-Z., Zhang, S.-X., Miao, Y.-L., Xiong, J.-J., & Huo, L.-J. (2020). Triclocarban exposure affects mouse oocyte in vitro maturation through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Environmental Pollution*, 262, 114271. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114271>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.10.030>
- Drutovic, D., Duan, X., Li, R., Kalab, P., & Solc, P. (2020). Ran GTP and importin β regulate meiosis I spindle assembly and function in mouse oocytes. *The EMBO Journal*, 39(1), e101689. <https://doi.org/10.15252/embj.2019101689>
- Du, Y., Wang, B., Cai, Z., Zhang, H., Wang, B., Liang, W., Zhou, G., Ouyang, F., & Wang, W. (2021). The triclosan-induced shift from aerobic to anaerobic metabolism link to increased steroidogenesis in human ovarian granulosa cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220, 112389. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112389>

- Ducibella, T., Duffy, P., & Buetow, J. (1994). Quantification and Localization of Cortical Granules during Oogenesis in the Mouse1. *Biology of Reproduction*, *50*(3), 467–473. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.3.467>
- Dwyer, A. A., & Quinton, R. (2019). Anatomy and Physiology of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal (HPG) Axis. In S. Llahana, C. Follin, C. Yedinak, & A. Grossman (Ed.), *Advanced Practice in Endocrinology Nursing* (s. 839–852). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99817-6_43
- Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. (2009). The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. *Endocrine Reviews*, *30*(6), 624–712. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0012>
- Enserink, J. M., & Kolodner, R. D. (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Division*, *5*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-5-11>
- Eppig, J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, *122*(6), 829–838. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220829>
- Erickson, G. F., & Shimasaki, S. (2003). The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *1*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-9>
- Erickson, G. F., Wang, C., & Hsueh, A. J. W. (1979). FSH induction of functional LH receptors in granulosa cells cultured in a chemically defined medium. *Nature*, *279*(5711), 336–338. <https://doi.org/10.1038/279336a0>
- Etzel, T. M., Calafat, A. M., Ye, X., Chen, A., Lanphear, B. P., Savitz, D. A., Yolton, K., & Braun, J. M. (2017). Urinary triclosan concentrations during pregnancy and birth outcomes. *Environmental Research*, *156*, 505–511. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.04.015>
- Evans, G., Dobias, M., King, G. J., & Armstrong, D. T. (1981). Estrogen, Androgen, and Progesterone Biosynthesis by Theca and Granulosa of Preovulatory Follicles in the Pig1. *Biology of Reproduction*, *25*(4), 673–682. <https://doi.org/10.1095/biolreprod25.4.673>
- Fan, H., Tong, C., Chen, D., & Sun, Q. (2002). Roles of MAP kinase signaling pathway in oocyte meiosis. *Chinese Science Bulletin*, *47*(14), 1157–1162. <https://doi.org/10.1007/BF02907599>
- Fan, H.-Y., & Sun, Q.-Y. (2004). Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade During Oocyte Maturation and Fertilization in Mammals1. *Biology of Reproduction*, *70*(3), 535–547. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.022830>
- Feng, Y., Zhang, P., Zhang, Z., Shi, J., Jiao, Z., & Shao, B. (2016). Endocrine Disrupting Effects of Triclosan on the Placenta in Pregnant Rats. *PLOS ONE*, *11*(5), e0154758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154758>

- Fernandez, M. F., Arrebola, J. P., Taoufiki, J., Navalón, A., Ballesteros, O., Pulgar, R., Vilchez, J. L., & Olea, N. (2007). Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.06.007>
- Filardo, E. J., & Thomas, P. (2005). GPR30: A seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 16(8), 362–367. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.08.005>
- Filardo, E., Quinn, J., Pang, Y., Graeber, C., Shaw, S., Dong, J., & Thomas, P. (2007). Activation of the Novel Estrogen Receptor G Protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) at the Plasma Membrane. *Endocrinology*, 148(7), 3236–3245. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1605>
- Fissore, R. A., He, C. L., & Vande Woude, G. F. (1996). Potential Role of Mitogen-Activated Protein Kinase during Meiosis Resumption in Bovine Oocytes1. *Biology of Reproduction*, 55(6), 1261–1270. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.6.1261>
- FitzHarris, G., Marangos, P., & Carroll, J. (2007). Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. *Developmental Biology*, 305(1), 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.02.006>
- Fu, H., Wada-Hiraike, O., Hirano, M., Kawamura, Y., Sakurabashi, A., Shirane, A., Morita, Y., Isono, W., Oishi, H., Koga, K., Oda, K., Kawana, K., Yano, T., Kurihara, H., Osuga, Y., & Fujii, T. (2014). SIRT3 Positively Regulates the Expression of Folliculogenesis- and Luteinization-Related Genes and Progesterone Secretion by Manipulating Oxidative Stress in Human Luteinized Granulosa Cells. *Endocrinology*, 155(8), 3079–3087. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1025>
- Gao, H., Yang, B.-J., Li, N., Feng, L.-M., Shi, X.-Y., Zhao, W.-H., & Liu, S.-J. (2015). Bisphenol A and Hormone-Associated Cancers: Current Progress and Perspectives. *Medicine*, 94(1), e211. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000211>
- Ge, H., Tollner, T. L., Hu, Z., Dai, M., Li, X., Guan, H., Shan, D., Zhang, X., Lv, J., Huang, C., & Dong, Q. (2012). The importance of mitochondrial metabolic activity and mitochondrial DNA replication during oocyte maturation in vitro on oocyte quality and subsequent embryo developmental competence. *Molecular Reproduction and Development*, 79(6), 392–401. <https://doi.org/10.1002/mrd.22042>
- Geens, T., Dirtu, A. C., Dirinck, E., Malarvannan, G., Van Gaal, L., Jorens, P. G., & Covaci, A. (2015). Daily intake of bisphenol A and triclosan and their association with anthropometric data, thyroid hormones and weight loss in overweight and obese individuals. *Environment International*, 76, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.12.003>
- Geens, T., Neels, H., & Covaci, A. (2012). Distribution of bisphenol-A, triclosan and n-nonylphenol in human adipose tissue, liver and brain. *Chemosphere*, 87(7), 796–802. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.002>

- George, O., Bryant, B. K., Chinnasamy, R., Corona, C., Arterburn, J. B., & Shuster, C. B. (2008). Bisphenol A Directly Targets Tubulin to Disrupt Spindle Organization in Embryonic and Somatic Cells. *ACS Chemical Biology*, 3(3), 167–179. <https://doi.org/10.1021/cb700210u>
- Gharbi-Ayachi, A., Labbé, J.-C., Burgess, A., Vigneron, S., Strub, J.-M., Brioude, E., Van-Dorselaer, A., Castro, A., & Lorca, T. (2010). The Substrate of Greatwall Kinase, Arpp19, Controls Mitosis by Inhibiting Protein Phosphatase 2A. *Science*, 330(6011), 1673–1677. <https://doi.org/10.1126/science.1197048>
- Glanzner, W. G., Wachter, A., Coutinho, A. R. S., Albornoz, M. S., Duggavathi, R., Gonçaves, P. B. D., & Bordignon, V. (2017). Altered expression of BRG1 and histone demethylases, and aberrant H3K4 methylation in less developmentally competent embryos at the time of embryonic genome activation. *Molecular Reproduction and Development*, 84(1), 19–29. <https://doi.org/10.1002/mrd.22762>
- Gomperts, M., Garcia-Castro, M., Wylie, C., & Heasman, J. (1994). Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development*, 120(1), 135–141. <https://doi.org/10.1242/dev.120.1.135>
- Gordo, A. C., He, C. L., Smith, S., & Fissore, R. A. (2001). Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 59(1), 106–114. <https://doi.org/10.1002/mrd.1012>
- Gould, J. C., Leonard, L. S., Maness, S. C., Wagner, B. L., Conner, K., Zacharewski, T., Safe, S., McDonnell, D. P., & Gaido, K. W. (1998). Bisphenol A interacts with the estrogen receptor α in a distinct manner from estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 142(1–2), 203–214. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00084-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00084-7)
- Greve, J. M., Salzman, G. S., Roller, R. J., & Wassarman, P. M. (1982). Biosynthesis of the major zona pellucida glycoprotein secreted by oocytes during mammalian oogenesis. *Cell*, 31(3), 749–759. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90329-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90329-4)
- Grimm, S. L., Hartig, S. M., & Edwards, D. P. (2016). Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *Journal of Molecular Biology*, 428(19), 3831–3849. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.06.020>
- Gu, L., Wang, Q., & Sun, Q.-Y. (2010). Histone modifications during mammalian oocyte maturation: Dynamics, regulation and functions. *Cell Cycle*, 9(10), 1942–1950. <https://doi.org/10.4161/cc.9.10.11599>
- Gueth-Hallonet, C., Antony, C., Aghion, J., Santa-Maria, A., Lajoie-Mazenc, I., Wright, M., & Maro, B. (1993). γ -Tubulin is present in acentriolar MTOCs during early mouse development. *Journal of Cell Science*, 105(1), 157–166. <https://doi.org/10.1242/jcs.105.1.157>
- Guillen, J., Bernabeu, A., Shapiro, S., & Villalain, J. (2004). Location and orientation of Triclosan in phospholipid model membranes. *European Biophysics Journal*, 33(5). <https://doi.org/10.1007/s00249-003-0378-8>

- Haccard, O., Sarcevic, B., Lewellyn, A., Hartley, R., Roy, L., Izumi, T., Erikson, E., & Maller, J. (1993). Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science*, *262*(5137), 1262–1265. <https://doi.org/10.1126/science.8235656>
- Han, C., Lim, Y.-H., & Hong, Y.-C. (2016). Ten-year trends in urinary concentrations of triclosan and benzophenone-3 in the general U.S. population from 2003 to 2012. *Environmental Pollution*, *208*, 803–810. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.002>
- Han, S. J., Chen, R., Paronetto, M. P., & Conti, M. (2005). Wee1B Is an Oocyte-Specific Kinase Involved in the Control of Meiotic Arrest in the Mouse. *Current Biology*, *15*(18), 1670–1676. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.056>
- Hashimoto, N., & Kishimoto, T. (1988). Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Developmental Biology*, *126*(2), 242–252. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(88\)90135-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90135-2)
- He, M., Zhang, T., Yang, Y., & Wang, C. (2021). Mechanisms of Oocyte Maturation and Related Epigenetic Regulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 654028. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.654028>
- He, Y., Li, J., Peng, L., Li, Q., Chu, Y., Lin, Q., Dai, J., Rui, R., & Ju, S. (2022). Effects of Ran-GTP/importin β inhibition on the meiotic division of porcine oocytes. *Histochemistry and Cell Biology*, *158*(6), 571–582. <https://doi.org/10.1007/s00418-022-02134-9>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.08.019>
- Holt, J. E., Lane, S. I. R., & Jones, K. T. (2013). The Control of Meiotic Maturation in Mammalian Oocytes. In *Current Topics in Developmental Biology* (Roč. 102, s. 207–226). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416024-8.00007-6>
- Holubcová, Z., Blayney, M., Elder, K., & Schuh, M. (2015). Error-prone chromosome-mediated spindle assembly favors chromosome segregation defects in human oocytes. *Science*, *348*(6239), 1143–1147. <https://doi.org/10.1126/science.aaa9529>
- Hontelez, S., Van Kruijsbergen, I., Georgiou, G., Van Heeringen, S. J., Bogdanovic, O., Lister, R., & Veenstra, G. J. C. (2015). Embryonic transcription is controlled by maternally defined chromatin state. *Nature Communications*, *6*(1), 10148. <https://doi.org/10.1038/ncomms10148>
- Houtkooper, R. H., Pirinen, E., & Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(4), 225–238. <https://doi.org/10.1038/nrm3293>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00189-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00189-1)

- Chang, H., & Matzuk, M. M. (2001). Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. *Mechanisms of Development*, 104(1–2), 61–67. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00367-7](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00367-7)
- Channing, C. P., Hillensjo, T., & Schaerf, F. W. (1978). Hormonal control of oocyte meiosis, ovulation and luteinization in mammals. *Clinics in Endocrinology and Metabolism*, 7(3), 601–624. [https://doi.org/10.1016/S0300-595X\(78\)80011-5](https://doi.org/10.1016/S0300-595X(78)80011-5)
- Chao, H.-H., Zhang, X.-F., Chen, B., Pan, B., Zhang, L.-J., Li, L., Sun, X.-F., Shi, Q.-H., & Shen, W. (2012). Bisphenol A exposure modifies methylation of imprinted genes in mouse oocytes via the estrogen receptor signaling pathway. *Histochemistry and Cell Biology*, 137(2), 249–259. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0894-z>
- Chen, L., Wert, S. E., Hendrix, E. M., Russell, P. T., Cannon, M., & Larsen, W. J. (1990). Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Molecular Reproduction and Development*, 26(3), 236–247. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080260307>
- Chen, W., Yang, X., Wang, B., Wang, L., & Yu, X. (2019). The effects and possible mechanisms of triclosan on steroidogenesis in primary rat granulosa cells. *Reproductive Toxicology*, 83, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.11.001>
- Christensen, A., Bentley, G., Cabrera, R., Ortega, H., Perfito, N., Wu, T., & Micevych, P. (2012). Hormonal Regulation of Female Reproduction. *Hormone and Metabolic Research*, 44(08), 587–591. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1306301>
- Chu, G. C., Dunn, N. R., Anderson, D. C., Oxburgh, L., & Robertson, E. J. (2004). Differential requirements for Smad4 in TGF β -dependent patterning of the early mouse embryo. *Development*, 131(15), 3501–3512. <https://doi.org/10.1242/dev.01248>
- Chuanchuen, R., Karkhoff-Schweizer, R. R., & Schweizer, H. P. (2003). High-level triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is solely a result of efflux. *American Journal of Infection Control*, 31(2), 124–127. <https://doi.org/10.1067/mic.2003.11>
- Chun, S. Y., Eisenhauer, K. M., Minami, S., Billig, H., Perlas, E., & Hsueh, A. J. (1996). Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: Follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*, 137(4), 1447–1456. <https://doi.org/10.1210/endo.137.4.8625923>
- Iljas, J. D., & Homer, H. A. (2020). Sirt3 is dispensable for oocyte quality and female fertility in lean and obese mice. *The FASEB Journal*, 34(5), 6641–6653. <https://doi.org/10.1096/fj.202000153R>
- Ishibashi, H., Matsumura, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H., Ishibashi, Y., Takao, Y., & Arizono, K. (2004). Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquatic Toxicology*, 67(2), 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.12.005>
- Itami, N., Shirasuna, K., Kuwayama, T., & Iwata, H. (2018). Short-term heat stress induces mitochondrial degradation and biogenesis and enhances mitochondrial quality in

- porcine oocytes. *Journal of Thermal Biology*, 74, 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.04.010>
- Ito, J., Shirasuna, K., Kuwayama, T., & Iwata, H. (2020). Resveratrol treatment increases mitochondrial biogenesis and improves viability of porcine germinal-vesicle stage vitrified-warmed oocytes. *Cryobiology*, 93, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.02.014>
- Iyer, A. P., Xue, J., Honda, M., Robinson, M., Kumosani, T. A., Abulnaja, K., & Kannan, K. (2018). Urinary levels of triclosan and triclocarban in several Asian countries, Greece and the USA: Association with oxidative stress. *Environmental Research*, 160, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.09.021>
- James, M. O., Li, W., Summerlot, D. P., Rowland-Faux, L., & Wood, C. E. (2010). Triclosan is a potent inhibitor of estradiol and estrone sulfonation in sheep placenta. *Environment International*, 36(8), 942–949. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.02.004>
- Ji, K., Hong, S., Kho, Y., & Choi, K. (2013). Effects of Bisphenol S Exposure on Endocrine Functions and Reproduction of Zebrafish. *Environmental Science & Technology*, 47(15), 8793–8800. <https://doi.org/10.1021/es400329t>
- Jones, K. T. (2011). Anaphase-Promoting Complex Control in Female Mouse Meiosis. In J. Z. Kubiak (Ed.), *Cell Cycle in Development* (s. 343–363). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19065-0_15
- Jones, R. L., & Pepling, M. E. (2013). KIT signaling regulates primordial follicle formation in the neonatal mouse ovary. *Developmental Biology*, 382(1), 186–197. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.06.030>
- Kawamura, Y., Uchijima, Y., Horike, N., Tonami, K., Nishiyama, K., Amano, T., Asano, T., Kurihara, Y., & Kurihara, H. (2010). Sirt3 protects in vitro–fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress–induced p53-mediated developmental arrest. *Journal of Clinical Investigation*, 120(8), 2817–2828. <https://doi.org/10.1172/JCI42020>
- Kelce, W. R., Stone, C. R., Laws, S. C., Gray, L. E., Kemppainen, J. A., & Wilson, E. M. (1995). Persistent DDT metabolite p, p'–DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*, 375(6532), 581–585.
- Khan-Dawood, F. S., Goldsmith, L. T., Weiss, G., & Dawood, M. Y. (1989). Human Corpus Luteum Secretion of Relaxin, Oxytocin, and Progesterone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 68(3), 627–631. <https://doi.org/10.1210/jcem-68-3-627>
- Kim, K., Park, H., Yang, W., & Lee, J. H. (2011). Urinary concentrations of bisphenol A and triclosan and associations with demographic factors in the Korean population. *Environmental Research*, 111(8), 1280–1285. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.09.003>

- Kim, S. A., Moon, H., Lee, K., & Rhee, M. S. (2015). Bactericidal effects of triclosan in soap both *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *dkv275*. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv275>
- Kim, Y., Lee, I., Jo, Y., Kim, N., & 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>
- Kinyamu, H. K., & Archer, T. K. (2004). Modifying chromatin to permit steroid hormone receptor-dependent transcription. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, *1677*(1–3), 30–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2003.09.015>
- Kobayashi, H., Sakurai, T., Imai, M., Takahashi, N., Fukuda, A., Yayoi, O., Sato, S., Nakabayashi, K., Hata, K., Sotomaru, Y., Suzuki, Y., & Kono, T. (2012). Contribution of Intragenic DNA Methylation in Mouse Gametic DNA Methylomes to Establish Oocyte-Specific Heritable Marks. *PLoS Genetics*, *8*(1), e1002440. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002440>
- Kobayashi, T., Zhang, H., Tang, W. W. C., Irie, N., Withey, S., Klisch, D., Sybirna, A., Dietmann, S., Contreras, D. A., Webb, R., Allegrucci, C., Alberio, R., & Surani, M. A. (2017). Principles of early human development and germ cell program from conserved model systems. *Nature*, *546*(7658), 416–420. <https://doi.org/10.1038/nature22812>
- Kosińska, K., & Szychowski, K. A. (2024). Current state of knowledge of triclosan (TCS)-dependent reactive oxygen species (ROS) production. *Environmental Research*, *250*, 118532. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118532>
- Krzastek, S. C., Farhi, J., Gray, M., & Smith, R. P. (2020). Impact of environmental toxin exposure on male fertility potential. *Translational Andrology and Urology*, *9*(6), 2797–2813. <https://doi.org/10.21037/tau-20-685>
- Kubiak, J. Z., Weber, M., De Pennart, H., Winston, N. J., & Maro, B. (1993). The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *The EMBO Journal*, *12*(10), 3773–3778. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06055.x>
- Kumar, T. R., Wang, Y., Lu, N., & Matzuk, M. M. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetics*, *15*(2), 201–204. <https://doi.org/10.1038/ng0297-201>
- Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A. J., Zeinstra, L. M., Davis, A. M., Wright, C. V. E., Korving, J. P. W. F. M., & Hogan, B. L. M. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes & Development*, *13*(4), 424–436. <https://doi.org/10.1101/gad.13.4.424>
- Leclerc, F., Dubois, M.-F., & Aris, A. (2014). Maternal, placental and fetal exposure to bisphenol A in women with and without preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*, *33*(3), 341–348. <https://doi.org/10.3109/10641955.2014.892607>

- Lee, I., Jo, Y., Jung, S., Wang, H., Kim, N., & Namgoong, S. (2018). Distinct roles of Cep192 and Cep152 in acentriolar MTOCs and spindle formation during mouse oocyte maturation. *The FASEB Journal*, 32(2), 625–638. <https://doi.org/10.1096/fj.201700559RR>
- Lee, J. B., Lee, M. G., Lin, T., Shin, H. Y., Lee, J. E., Kang, J. W., & Jin, D.-I. (2019). Effect of oocyte chromatin status in porcine follicles on the embryo development in vitro. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32(7), 956–965. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0739>
- Lee, J., Kitajima, T. S., Tanno, Y., Yoshida, K., Morita, T., Miyano, T., Miyake, M., & Watanabe, Y. (2008). Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. *Nature Cell Biology*, 10(1), 42–52. <https://doi.org/10.1038/ncb1667>
- Lee, J., Miyano, T., & Moor, R. M. (2000). Spindle Formation and Dynamics of γ -Tubulin and Nuclear Mitotic Apparatus Protein Distribution During Meiosis in Pig and Mouse Oocytes1. *Biology of Reproduction*, 62(5), 1184–1192. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.5.1184>
- Lee, S.-K., Zhao, M.-H., Kwon, J.-W., Li, Y.-H., Lin, Z.-L., Jin, Y.-X., Kim, N.-H., & Cui, X.-S. (2014). The Association of Mitochondrial Potential and Copy Number with Pig Oocyte Maturation and Developmental Potential. *Journal of Reproduction and Development*, 60(2), 128–135. <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-098>
- Li, H., Zhao, Y., Chen, L., Su, Y., Li, X., Jin, L., & Ge, R.-S. (2017). Triclocarban and Triclosan Inhibit Human Aromatase via Different Mechanisms. *BioMed Research International*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/8284097>
- Li, L., & Yang, X.-J. (2015). Tubulin acetylation: Responsible enzymes, biological functions and human diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(22), 4237–4255. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2000-5>
- Li, M. (2002). MAPK regulates cell cycle progression in pig oocytes and fertilized eggs. *Chinese Science Bulletin*, 47(10), 843. <https://doi.org/10.1360/02tb9190>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nrm3531>
- Li, X., Liu, X., Gao, M., Han, L., Qiu, D., Wang, H., Xiong, B., Sun, S.-C., Liu, H., & Gu, L. (2017). HDAC3 promotes meiotic apparatus assembly in mouse oocytes via modulating tubulin acetylation. *Development*, dev.153353. <https://doi.org/10.1242/dev.153353>
- Li, X., Ying, G.-G., Su, H.-C., Yang, X.-B., & Wang, L. (2010). Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. *Environment International*, 36(6), 557–562. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.04.009>

- Lincoln, A. J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R. M., Palko, M. E., De Miguel, M. P. D., Tessarollo, L., & Donovan, P. J. (2002). Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nature Genetics*, *30*(4), 446–449. <https://doi.org/10.1038/ng856>
- Lindström, A., Buerge, I. J., Poiger, T., Bergqvist, P.-A., Müller, M. D., & Buser, H.-R. (2002). Occurrence and Environmental Behavior of the Bactericide Triclosan and Its Methyl Derivative in Surface Waters and in Wastewater. *Environmental Science & Technology*, *36*(11), 2322–2329. <https://doi.org/10.1021/es0114254>
- Liu, C., Peng, J., Matzuk, M. M., & Yao, H. H.-C. (2015). Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells. *Nature Communications*, *6*(1), 6934. <https://doi.org/10.1038/ncomms7934>
- Liu, Y., Wang, Y.-L., Chen, M.-H., Zhang, Z., Xu, B.-H., Liu, R., Xu, L., He, S.-W., Li, F.-P., Qi, Z.-Q., & Wang, H.-L. (2016). Methoxychlor exposure induces oxidative stress and affects mouse oocyte meiotic maturation: Methoxychlor affects mouse oocyte maturation. *Molecular Reproduction and Development*, *83*(9), 768–779. <https://doi.org/10.1002/mrd.22683>
- Lodde, V., Modina, S., Maddox-Hyttel, P., Franciosi, F., Lauria, A., & Luciano, A. M. (2008). Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. *Molecular Reproduction and Development*, *75*(5), 915–924. <https://doi.org/10.1002/mrd.20824>
- Louis, G. W., Hallinger, D. R., Braxton, M. J., Kamel, A., & Stoker, T. E. (2017). Effects of chronic exposure to triclosan on reproductive and thyroid endpoints in the adult Wistar female rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, *80*(4), 236–249. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1287029>
- Loup, B., Poumerol, E., Jouneau, L., Fowler, P. A., Cotinot, C., & Mandon-Pépin, B. (2022). BPA disrupts meiosis I in oogonia by acting on pathways including cell cycle regulation, meiosis initiation and spindle assembly. *Reproductive Toxicology*, *111*, 166–177. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.06.001>
- Lu, J., Jin, M., Nguyen, S. H., Mao, L., Li, J., Coin, L. J. M., Yuan, Z., & Guo, J. (2018). Non-antibiotic antimicrobial triclosan induces multiple antibiotic resistance through genetic mutation. *Environment International*, *118*, 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.06.004>
- Lu, J., Wang, Y., Zhang, S., Bond, P., Yuan, Z., & Guo, J. (2020). Triclosan at environmental concentrations can enhance the spread of extracellular antibiotic resistance genes through transformation. *Science of The Total Environment*, *713*, 136621. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136621>
- Lunney, J. K., Van Goor, A., Walker, K. E., Hailstock, T., Franklin, J., & Dai, C. (2021). Importance of the pig as a human biomedical model. *Science Translational Medicine*, *13*(621), eabd5758. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd5758>

- Ma, W., Baumann, C., & Viveiros, M. M. (2010). NEDD1 is crucial for meiotic spindle stability and accurate chromosome segregation in mammalian oocytes. *Developmental Biology*, 339(2), 439–450. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.01.009>
- Madgwick, S., & Jones, K. T. (2007). How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals Cytostatic Factor. *Cell Division*, 2(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-2-4>
- Magnusson, U. (2005). Can farm animals help to study endocrine disruption? *Domestic Animal Endocrinology*, 29(2), 430–435. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.02.034>
- Magoffin, D. A. (2005). Ovarian theca cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(7), 1344–1349. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.016>
- Machtinger, R., Combelles, C. M., Missmer, S. A., Correia, K. F., Williams, P., Hauser, R., & Racowsky, C. (2013). Bisphenol-A and human oocyte maturation in vitro. *Human reproduction*, 28(10), 2735–2745.
- Manandhar, G., Schatten, H., & Sutovsky, P. (2005). Centrosome Reduction During Gametogenesis and Its Significance1. *Biology of Reproduction*, 72(1), 2–13. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.031245>
- 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), e102091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102091>
- Mao, J., Whitworth, K. M., Spate, L. D., Walters, E. M., Zhao, J., & Prather, R. S. (2012). Regulation of oocyte mitochondrial DNA copy number by follicular fluid, EGF, and neuregulin 1 during in vitro maturation affects embryo development in pigs. *Theriogenology*, 78(4), 887–897. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.002>
- Marangos, P., & Carroll, J. (2004). The dynamics of cyclin B1 distribution during meiosis I in mouse oocytes. *Reproduction*, 128(2), 153–162. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00192>
- Marchal, R., Vigneron, C., Perreau, C., Bali-Papp, A., & Mermillod, P. (2002). Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*, 57(5), 1523–1532. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00655-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00655-6)
- Marino, M., Galluzzo, P., & Ascenzi, P. (2006). Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription. *Current Genomics*, 7(8), 497–508. <https://doi.org/10.2174/138920206779315737>
- Maruo, T., Laoag-Fernandez, J. B., Takekida, S., Peng, X., Deguchi, J., Samoto, T., Kondo, H., & Matsuo, H. (1999). Regulation of granulosa cell proliferation and apoptosis during follicular development. *Gynecological Endocrinology*, 13(6), 410–419. <https://doi.org/10.3109/09513599909167588>
- 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. *Journal of Clinical Investigation*, *114*(2), 196–205. <https://doi.org/10.1172/JCI21804>
- Masui, Y. (1991). The Role of “Cytostatic Factor (CSF)” in the Control of Oocyte Cell Cycles: A Summary of 20 Years of Study: (CSF/MPF/Cell Cycle/Metaphase Arrest). *Development, Growth & Differentiation*, *33*(6), 543–551. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1991.00543.x>
- Matthews, J. B., Twomey, K., & Zacharewski, T. R. (2001). In Vitro and in Vivo Interactions of Bisphenol A and Its Metabolite, Bisphenol A Glucuronide, with Estrogen Receptors α and β . *Chemical Research in Toxicology*, *14*(2), 149–157. <https://doi.org/10.1021/tx0001833>
- McLaren, A., & Lawson, K. A. (2005). How is the mouse germ-cell lineage established? *Differentiation*, *73*(9–10), 435–437. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2005.00049.x>
- McMurry, L. M., Oethinger, M., & Levy, S. B. (1998). Triclosan targets lipid synthesis. *Nature*, *394*(6693), 531–532. <https://doi.org/10.1038/28970>
- Mei, N., Guo, S., Zhou, Q., Zhang, Y., Liu, X., Yin, Y., He, X., Yang, J., Yin, T., & Zhou, L. (2023). H3K4 Methylation Promotes Expression of Mitochondrial Dynamics Regulators to Ensure Oocyte Quality in Mice. *Advanced Science*, *10*(12), 2204794. <https://doi.org/10.1002/advs.202204794>
- Menke, D. B., Koubova, J., & Page, D. C. (2003). Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Developmental Biology*, *262*(2), 303–312. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00391-9](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00391-9)
- Merdes, A., & Cleveland, D. W. (1997). Pathways of Spindle Pole Formation: Different Mechanisms; Conserved Components. *The Journal of Cell Biology*, *138*(5), 953–956. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.5.953>
- Michan, S., & Sinclair, D. (2007). Sirtuins in mammals: Insights into their biological function. *Biochemical Journal*, *404*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20070140>
- Miller, W. L. (1988). Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis. *Endocrine Reviews*, *9*(3), 295–318. <https://doi.org/10.1210/edrv-9-3-295>
- Mlynářčiková, A., Kolena, J., Ficková, M., & Scsuková, S. (2005). Alterations in steroid hormone production by porcine ovarian granulosa cells caused by bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *244*(1–2), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.02.009>
- Mlynářčiková, A., Nagyová, E., Ficková, M., & Scsuková, S. (2009). Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte–cumulus complexes. *Toxicology in Vitro*, *23*(3), 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.12.017>
- Molina-Molina, J.-M., Amaya, E., Grimaldi, M., Sáenz, J.-M., Real, M., Fernández, M. F., Balaguer, P., & Olea, N. (2013). In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear

- receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272(1), 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.015>
- Montagnini, B. G., Pernoncine, K. V., Borges, L. I., Costa, N. O., Moreira, E. G., Anselmo-Franci, J. A., Kiss, A. C. I., & Gerardin, D. C. C. (2018). Investigation of the potential effects of triclosan as an endocrine disruptor in female rats: Uterotrophic assay and two-generation study. *Toxicology*, 410, 152–165. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.10.005>
- Mordhorst, B. R., & Prather, R. S. (2017). Pig Models of Reproduction. In G. Constantinescu & H. Schatten (Ed.), *Animal Models and Human Reproduction* (1. vyd., s. 213–234). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118881286.ch9>
- Moss, T., Howes, D., & Williams, F. M. (2000). Percutaneous penetration and dermal metabolism of triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether). *Food and Chemical Toxicology*, 38(4), 361–370. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00164-7](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00164-7)
- Mosselman, S., Polman, J., & Dijkema, R. (1996). ER β : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters*, 392(1), 49–53. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00782-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00782-X)
- Motlík, J., Crozet, N., & Fulka, J. (1984). Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Reproduction*, 72(2), 323–328. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0720323>
- Motlík, J., & Fulka, J. (1976). Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Zoology*, 198(2), 155–162. <https://doi.org/10.1002/jez.1401980205>
- Motlík, J., & Fulka, J. (1986). Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*, 25(1), 87–96. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90185-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90185-8)
- Naderi, M., Wong, M. Y. L., & Gholami, F. (2014). Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquatic Toxicology*, 148, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.009>
- Namgoong, S., & Kim, N.-H. (2018). Meiotic spindle formation in mammalian oocytes: Implications for human infertility. *Biology of Reproduction*, 98(2), 153–161. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox145>
- Nevoral, J., Havránková, J., Kolinko, Y., Prokešová, Š., Fenclová, T., Monsef, L., Žalmanová, T., Petr, J., & Králíčková, M. (2021). Exposure to alternative bisphenols BPS and BPF through breast milk: Noxious heritage effect during nursing associated with idiopathic infertility. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 413, 115409. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115409>
- 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. <https://doi.org/10.1242/dev.035238>
- Oh, J. S., Susor, A., Schindler, K., Schultz, R. M., & Conti, M. (2013). Cdc25A activity is required for the metaphase II arrest in mouse oocytes. *Journal of Cell Science*, *126*(5), 1081–1085. <https://doi.org/10.1242/jcs.115592>
- Ohashi, S., Naito, K., Sugiura, K., Iwamori, N., Goto, S., Naruoka, H., & Tojo, H. (2003). Analyses of Mitogen-Activated Protein Kinase Function in the Maturation of Porcine Oocytes1. *Biology of Reproduction*, *68*(2), 604–609. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.008334>
- Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S. C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., Saitou, M., & Surani, M. A. (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*, *436*(7048), 207–213. <https://doi.org/10.1038/nature03813>
- Okamura, D., Kimura, T., Nakano, T., & Matsui, Y. (2003). Cadherin-mediated cell interaction regulates germ cell determination in mice. *Development*, *130*(26), 6423–6430. <https://doi.org/10.1242/dev.00870>
- Olaniyan, L. W. B., Mkwetshana, N., & Okoh, A. I. (2016). Triclosan in water, implications for human and environmental health. *SpringerPlus*, *5*(1), 1639. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3287-x>
- Pan, L.-Z., Zhu, S., Zhang, M., Sun, M.-J., Lin, J., Chen, F., & Tan, J.-H. (2018). A new classification of the germinal vesicle chromatin configurations in pig oocytes†. *Biology of Reproduction*, *99*(6), 1149–1158. <https://doi.org/10.1093/biolre/iy0139>
- Pan, M.-H., Wu, Y.-K., Liao, B.-Y., Zhang, H., Li, C., Wang, J.-L., Hu, L.-L., & Ma, B. (2021). Bisphenol A Exposure Disrupts Organelle Distribution and Functions During Mouse Oocyte Maturation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 661155. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.661155>
- Park, H.-J., Song, B.-S., Kim, J.-W., Yang, S.-G., Kim, S.-U., & Koo, D.-B. (2020). Exposure of Triclosan in Porcine Oocyte Leads to Superoxide Production and Mitochondrial-Mediated Apoptosis during In Vitro Maturation. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(9), 3050. <https://doi.org/10.3390/ijms21093050>
- Pepling, M. E., & C. Spradling, A. (1998). Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development*, *125*(17), 3323–3328. <https://doi.org/10.1242/dev.125.17.3323>
- Pepling, M. E., & Spradling, A. C. (2001). Mouse Ovarian Germ Cell Cysts Undergo Programmed Breakdown to Form Primordial Follicles. *Developmental Biology*, *234*(2), 339–351. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0269>
- Picton, H., Briggs, D., & Gosden, R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *145*(1–2), 27–37. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00166-X](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00166-X)

- Pietras, R. J., Nemere, I., & Szego, C. M. (2001). Steroid Hormone Receptors in Target Cell Membranes. *Endocrine*, *14*(3), 417–428. <https://doi.org/10.1385/ENDO:14:3:417>
- Piko, L., & Clegg, K. B. (1982). Quantitative changes in total RNA, total poly(A), and ribosomes in early mouse embryos. *Developmental Biology*, *89*(2), 362–378. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(82\)90325-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(82)90325-6)
- Pirino, G., Wescott, M. P., & Donovan, P. J. (2009). Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle*, *8*(4), 665–670. <https://doi.org/10.4161/cc.8.4.7846>
- Polanski, Z., Ledan, E., Brunet, S., Louvet, S., Verlhac, M.-H., Kubiak, J. Z., & Maro, B. (1998). Cyclin synthesis controls the progression of meiotic maturation in mouse oocytes. *Development*, *125*(24), 4989–4997. <https://doi.org/10.1242/dev.125.24.4989>
- Portran, D., Schaedel, L., Xu, Z., Théry, M., & Nachury, M. V. (2017). Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nature Cell Biology*, *19*(4), 391–398. <https://doi.org/10.1038/ncb3481>
- Prasad, S. V., Skinner, S. M., Carino, C., Wang, N., Cartwright, J., & Dunbar, B. S. (2000). Structure and Function of the Proteins of the Mammalian Zona pellucida. *Cells Tissues Organs*, *166*(2), 148–164. <https://doi.org/10.1159/000016730>
- Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, *7*(12), 715–726. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.122>
- Qi, X.-Y., Yuan, J.-D., Liu, Z.-Y., Jiang, X.-Q., Zhang, Q., Zhang, S.-L., Zhao, L., Ke, L.-Y., Zhang, C.-Y., Li, Y., Zhang, L.-Y., Xu, Q.-Q., Liu, Z.-H., Sun, J.-T., & Jin, J.-X. (2024). Sirtuin 3-mediated deacetylation of superoxide dismutase 2 ameliorates sodium fluoride-induced mitochondrial dysfunction in porcine oocytes. *Science of The Total Environment*, *908*, 168306. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168306>
- Racedo, S. E., Rawe, V. Y., & Niemann, H. (2012). Dynamic changes of the Golgi apparatus during bovine in vitro oocyte maturation. *REPRODUCTION*, *143*(4), 439–447. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0492>
- Radovick, S., Levine, J. E., & Wolfe, A. (2012). Estrogenic Regulation of the GnRH Neuron. *Frontiers in Endocrinology*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00052>
- Rardin, M. J., Newman, J. C., Held, J. M., Cusack, M. P., Sorensen, D. J., Li, B., Schilling, B., Mooney, S. D., Kahn, C. R., Verdin, E., & Gibson, B. W. (2013). Label-free quantitative proteomics of the lysine acetylome in mitochondria identifies substrates of SIRT3 in metabolic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(16), 6601–6606. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302961110>
- Ravitsky, V., & Kimmins, S. (2019). The forgotten men: Rising rates of male infertility urgently require new approaches for its prevention, diagnosis and treatment. *Biology of Reproduction*, *101*(5), 872–874. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox161>

- Raz, E. (2004). Guidance of primordial germ cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(2), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.01.004>
- Reynolds, L. P., & Redmer, D. A. (1999). Growth and development of the corpus luteum. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 54, 181–191.
- Ricking, M., & Schwarzbauer, J. (2012). DDT isomers and metabolites in the environment: An overview. *Environmental Chemistry Letters*, 10(4), 317–323. <https://doi.org/10.1007/s10311-012-0358-2>
- Rodgers, R. J., Irving-Rodgers, H. F., Van Wezel, I. L., Krupa, M., & Lavranos, T. C. (2001). Dynamics of the membrana granulosa during expansion of the ovarian follicular antrum. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 171(1–2), 41–48. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(00\)00430-5](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(00)00430-5)
- Rodríguez, P. E. A., & Sanchez, M. S. (2010). Maternal Exposure to Triclosan Impairs Thyroid Homeostasis and Female Pubertal Development in Wistar Rat Offspring. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 73(24), 1678–1688. <https://doi.org/10.1080/15287394.2010.516241>
- Rutkowska, A., & Rachoń, D. (2014). Bisphenol A (BPA) and its potential role in the pathogenesis of the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Gynecological Endocrinology*, 30(4), 260–265. <https://doi.org/10.3109/09513590.2013.871517>
- Rutkowska, A. Z., & Diamanti-Kandarakis, E. (2016). Polycystic ovary syndrome and environmental toxins. *Fertility and Sterility*, 106(4), 948–958. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.08.031>
- Sagata, N., Watanabe, N., Vande Woude, G. F., & Ikawa, Y. (1989). The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature*, 342(6249), 512–518. <https://doi.org/10.1038/342512a0>
- Saitou, M., Barton, S. C., & Surani, M. A. (2002). A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature*, 418(6895), 293–300. <https://doi.org/10.1038/nature00927>
- Sandborgh-Englund, G., Adolfsson-Erici, M., Odham, G., & Ekstrand, J. (2006). Pharmacokinetics of Triclosan Following Oral Ingestion in Humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 69(20), 1861–1873. <https://doi.org/10.1080/15287390600631706>
- Santos, R. R., Schoevers, E. J., & Roelen, B. A. (2014). Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 117. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-117>
- Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K., & Lai, F. A. (2002). PLC ζ : A sperm-specific trigger of Ca $^{2+}$ oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129(15), 3533–3544. <https://doi.org/10.1242/dev.129.15.3533>

- Sauve, A. A., Wolberger, C., Schramm, V. L., & Boeke, J. D. (2006). The Biochemistry of Sirtuins. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 435–465. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133500>
- Sendžikaitė, G., & Kelsey, G. (2019). The role and mechanisms of DNA methylation in the oocyte. *Essays in Biochemistry*, 63(6), 691–705. <https://doi.org/10.1042/EBC20190043>
- Serra, E., Succu, S., Berlinguer, F., Porcu, C., Leoni, G. G., Naitana, S., & Gadau, S. D. (2018). Tubulin posttranslational modifications in in vitro matured prepubertal and adult ovine oocytes. *Theriogenology*, 114, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.007>
- Sha, Q.-Q., Zhang, J., & Fan, H.-Y. (2020). Function and Regulation of Histone H3 Lysine-4 Methylation During Oocyte Meiosis and Maternal-to-Zygotic Transition. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 597498. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.597498>
- Shanmugam, G., Ramasamy, K., Selvaraj, K. K., Sampath, S., & Ramaswamy, B. R. (2014). Triclosan in Fresh Water Fish *Gibelion Catla* from the Kaveri River, India, and Its Consumption Risk Assessment. *Environmental Forensics*, 15(3), 207–212. <https://doi.org/10.1080/15275922.2014.930940>
- Sharma, R. P., Schuhmacher, M., & Kumar, V. (2017). Review on crosstalk and common mechanisms of endocrine disruptors: Scaffolding to improve PBPK/PD model of EDC mixture. *Environment International*, 99, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.09.016>
- Shen, Q., Liu, Y., Li, H., & Zhang, L. (2021). Effect of mitophagy in oocytes and granulosa cells on oocyte quality†. *Biology of Reproduction*, 104(2), 294–304. <https://doi.org/10.1093/biolre/iaaa194>
- Shirane, K., Toh, H., Kobayashi, H., Miura, F., Chiba, H., Ito, T., Kono, T., & Sasaki, H. (2013). Mouse Oocyte Methylomes at Base Resolution Reveal Genome-Wide Accumulation of Non-CpG Methylation and Role of DNA Methyltransferases. *PLoS Genetics*, 9(4), e1003439. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003439>
- Shoji, S., Yoshida, N., Amanai, M., Ohgishi, M., Fukui, T., Fujimoto, S., Nakano, Y., Kajikawa, E., & Perry, A. C. F. (2006). Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20. *The EMBO Journal*, 25(4), 834–845. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600953>
- Schatten, H., & Sun, Q. (2011). Centrosome dynamics during mammalian oocyte maturation with a focus on meiotic spindle formation. *Molecular Reproduction and Development*, 78(10–11), 757–768. <https://doi.org/10.1002/mrd.21380>
- Schmidt, A., Rauh, N. R., Nigg, E. A., & Mayer, T. U. (2006). Cytostatic factor: An activity that puts the cell cycle on hold. *Journal of Cell Science*, 119(7), 1213–1218. <https://doi.org/10.1242/jcs.02919>
- Schon, E. A., Kim, S. H., Ferreira, J. C., Magalhaes, P., Grace, M., Warburton, D., & Gross, S. J. (2000). Chromosomal non-disjunction in human oocytes: Is there a mitochondrial

- connection? *Human Reproduction*, *15*(suppl 2), 160–172.
https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_2.160
- Schönfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C. E., Paul, M., & Chahoud, I. (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environmental Health Perspectives*, *110*(11). <https://doi.org/10.1289/ehp.110-1241091>
- Schuh, M., & Ellenberg, J. (2007). Self-Organization of MTOCs Replaces Centrosome Function during Acentrosomal Spindle Assembly in Live Mouse Oocytes. *Cell*, *130*(3), 484–498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.025>
- Schuh, M., & Ellenberg, J. (2008). A New Model for Asymmetric Spindle Positioning in Mouse Oocytes. *Current Biology*, *18*(24), 1986–1992. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.11.022>
- Skakkebaek, N. E., Lindahl-Jacobsen, R., Levine, H., Andersson, A.-M., Jørgensen, N., Main, K. M., Lidegaard, Ø., Priskorn, L., Holmboe, S. A., Bräuner, E. V., Almstrup, K., Franca, L. R., Znaor, A., Kortenkamp, A., Hart, R. J., & Juul, A. (2022). Environmental factors in declining human fertility. *Nature Reviews Endocrinology*, *18*(3), 139–157. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00598-8>
- Soyal, S. M., Amleh, A., & Dean, J. (2000). FIG α , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*, *127*(21), 4645–4654. <https://doi.org/10.1242/dev.127.21.4645>
- Stenzel, A., Wirt, H., Patten, A., Theodore, B., & King-Heiden, T. (2019). Larval exposure to environmentally relevant concentrations of triclosan impairs metamorphosis and reproductive fitness in zebrafish. *Reproductive Toxicology*, *87*, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.05.055>
- 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 Culture1. *Biology of Reproduction*, *64*(3), 904–909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>
- Stoker, T. E., Gibson, E. K., & Zorrilla, L. M. (2010). Triclosan Exposure Modulates Estrogen-Dependent Responses in the Female Wistar Rat. *Toxicological Sciences*, *117*(1), 45–53. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq180>
- Sun, Q., Wu, G., Lai, L., Park, K., Cabot, R., Cheong, H., Day, B., Prather, R., & Schatten, H. (2001). Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction*, *122*(1), 155–163. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220155>
- Sun, Q. Y., Breitbart, H., & Schatten, H. (1999). Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reproduction, Fertility and Development*, *11*(8), 443. <https://doi.org/10.1071/RD00014>

- Sun, Q.-Y., Miao, Y.-L., & Schatten, H. (2009). Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. *Cell Cycle*, *8*(17), 2741–2747. <https://doi.org/10.4161/cc.8.17.9471>
- Sun, X., Liu, Y., Yue, K., Ma, S., & Tan, J. (2004). Changes in germinal vesicle (GV) chromatin configurations during growth and maturation of porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, *69*(2), 228–234. <https://doi.org/10.1002/mrd.20123>
- Szollosi, D., Calarco, P., & Donahue, R. P. (1972). Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. *Journal of Cell Science*, *11*(2), 521–541. <https://doi.org/10.1242/jcs.11.2.521>
- Takayanagi, S., Tokunaga, T., Liu, X., Okada, H., Matsushima, A., & Shimohigashi, Y. (2006). Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERR γ) with high constitutive activity. *Toxicology Letters*, *167*(2), 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.08.012>
- Tam, P. P. L., & Snow, M. H. L. (1981). Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *Development*, *64*(1), 133–147. <https://doi.org/10.1242/dev.64.1.133>
- Teilmann, S. C. (2005). Differential expression and localisation of connexin-37 and connexin-43 in follicles of different stages in the 4-week-old mouse ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *234*(1–2), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.10.014>
- Teplova, V. V., Belosludtsev, K. N., & Kruglov, A. G. (2017). Mechanism of triclosan toxicity: Mitochondrial dysfunction including complex II inhibition, superoxide release and uncoupling of oxidative phosphorylation. *Toxicology Letters*, *275*, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.05.004>
- Thomas, C., Cavazza, T., & Schuh, M. (2021). Aneuploidy in human eggs: Contributions of the meiotic spindle. *Biochemical Society Transactions*, *49*(1), 107–118. <https://doi.org/10.1042/BST20200043>
- Thomas, F. H., Ethier, J.-F., Shimasaki, S., & Vanderhyden, B. C. (2005). Follicle-Stimulating Hormone Regulates Oocyte Growth by Modulation of Expression of Oocyte and Granulosa Cell Factors. *Endocrinology*, *146*(2), 941–949. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0826>
- Tomizawa, S., Kobayashi, H., Watanabe, T., Andrews, S., Hata, K., Kelsey, G., & Sasaki, H. (2011). Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes. *Development*, *138*(5), 811–820. <https://doi.org/10.1242/dev.061416>
- Tomizawa, S.-I., Nowacka-Woszek, J., & Kelsey, G. (2012). DNA methylation establishment during oocyte growth: Mechanisms and significance. *The International Journal of Developmental Biology*, *56*(10-11-12), 867–875. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120152gk>

- Tremblay, K. D., Dunn, N. R., & Robertson, E. J. (2001). Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. *Development*, *128*(18), 3609–3621. <https://doi.org/10.1242/dev.128.18.3609>
- Trombly, D., Woodruff, T., & Mayo, K. (2009). Roles for Transforming Growth Factor Beta Superfamily Proteins in Early Folliculogenesis. *Seminars in Reproductive Medicine*, *27*(01), 014–023. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1108006>
- Tsafiriri, A., & Reich, R. (2009). Molecular aspects of mammalian ovulation. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, *107*(01), 1–11. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1212066>
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501108102>
- Tunquist, B. J., Eyers, P. A., Chen, L. G., Lewellyn, A. L., & Maller, J. L. (2003). Spindle checkpoint proteins Mad1 and Mad2 are required for cytostatic factor-mediated metaphase arrest. *The Journal of Cell Biology*, *163*(6), 1231–1242. <https://doi.org/10.1083/jcb.200306153>
- Tunquist, B. J., Schwab, M. S., Chen, L. G., & Maller, J. L. (2002). The Spindle Checkpoint Kinase Bub1 and Cyclin E/Cdk2 Both Contribute to the Establishment of Meiotic Metaphase Arrest by Cytostatic Factor. *Current Biology*, *12*(12), 1027–1033. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00894-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00894-1)
- Uda, M., Ottolenghi, C., Crisponi, L., Garcia, J. E., Deiana, M., Kimber, W., Forabosco, A., Cao, A., Schlessinger, D., & Pilia, G. (2004). Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Human Molecular Genetics*, *13*(11), 1171–1181. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh124>
- Uysal, F., Akkoyunlu, G., & Ozturk, S. (2015). Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. *Biochimie*, *116*, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.06.019>
- Uysal, F., & Ozturk, S. (2017). DNA Methyltransferases in Mammalian Oocytes. In M. Kloc (Ed.), *Oocytes* (Roč. 63, s. 211–222). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60855-6_10
- Van Den Hurk, R., & Zhao, J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, *63*(6), 1717–1751. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.005>
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A. M., Vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., & Myers, J. P. (2012). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*, *33*(3), 378–455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>

- 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. <https://doi.org/10.1101/gad.3.12b.2163>
- Verlhac, M.-H., De Pennart, H., Maro, B., Cobb, M. H., & Clarke, H. J. (1993). MAP Kinase Becomes Stably Activated at Metaphase and Is Associated with Microtubule-Organizing Centers during Meiotic Maturation of Mouse Oocytes. *Developmental Biology*, 158(2), 330–340. <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1192>
- Verlhac, M.-H., Kubiak, J. Z., Weber, M., Géraud, G., Colledge, W. H., Evans, M. J., & Maro, B. (1996). Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development*, 122(3), 815–822. <https://doi.org/10.1242/dev.122.3.815>
- Verrotti, A. C., Thompson, S. R., Wreden, C., Strickland, S., & Wickens, M. (1996). Evolutionary conservation of sequence elements controlling cytoplasmic polyadenylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(17), 9027–9032. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9027>
- Vincent, S. D., Dunn, N. R., Sciammas, R., Shapiro-Shalef, M., Davis, M. M., Calame, K., Bikoff, E. K., & Robertson, E. J. (2005). The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. *Development*, 132(6), 1315–1325. <https://doi.org/10.1242/dev.01711>
- Walker, D. M., & Gore, A. C. (2017). Epigenetic impacts of endocrine disruptors in the brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 44, 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2016.09.002>
- Wang, C.-F., & Tian, Y. (2015). Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population exposure, present evidence and potential mechanisms. *Environmental Pollution*, 206, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.07.001>
- Wang, F., Guo, X., Chen, W., Sun, Y., & Fan, C. (2017). Effects of triclosan on hormones and reproductive axis in female Yellow River carp (*Cyprinus carpio*): Potential mechanisms underlying estrogen effect. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 336, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.10.005>
- Wang, F., Zheng, F., & Liu, F. (2020). Effects of triclosan on antioxidant- and apoptosis-related genes expression in the gill and ovary of zebrafish. *Experimental Animals*, 69(2), 199–206. <https://doi.org/10.1538/expanim.19-0115>
- Wang, L.-Q., Falany, C. N., & James, M. O. (2004). Triclosan as a substrate and inhibitor of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate-sulfotransferase and UDP-glucuronosyl transferase in human liver fractions. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(10), 1162–1169. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.000273>
- Wang, T., Han, J., Duan, X., Xiong, B., Cui, X.-S., Kim, N.-H., Liu, H.-L., & Sun, S.-C. (2016). The toxic effects and possible mechanisms of Bisphenol A on oocyte

- maturation of porcine *in vitro*. *Oncotarget*, 7(22), 32554–32565. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8689>
- Wang, X., & Pepling, M. E. (2021). Regulation of Meiotic Prophase One in Mammalian Oocytes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 667306. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.667306>
- Wassarman, P. M., Josefowicz, W. J., & Letourneau, G. E. (1976). Meiotic maturation of mouse oocytes *In Vitro*: inhibition of maturation at specific stages of nuclear progression. *Journal of Cell Science*, 22(3), 531–545. <https://doi.org/10.1242/jcs.22.3.531>
- Wassarman, P. M., Liu, C., & Litscher, E. S. (1996). Constructing the mammalian egg zona pellucida: Some new pieces of an old puzzle. *Journal of Cell Science*, 109(8), 2001–2004. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.8.2001>
- Watanabe, N., Vande Woude, G. F., Ikawa, Y., & Sagata, N. (1989). Specific proteolysis of the c-mos proto-oncogene product by calpain on fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*, 342(6249), 505–511. <https://doi.org/10.1038/342505a0>
- Watanabe, Y. (2012). Geometry and force behind kinetochore orientation: Lessons from meiosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(6), 370–382. <https://doi.org/10.1038/nrm3349>
- Watanabe, Y., & Nurse, P. (1999). Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature*, 400(6743), 461–464. <https://doi.org/10.1038/22774>
- Weatherly, L. M., & Gosse, J. A. (2017). Triclosan exposure, transformation, and human health effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 20(8), 447–469. <https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1399306>
- Weatherly, L. M., Nelson, A. J., Shim, J., Riitano, A. M., Gerson, E. D., Hart, A. J., De Juan-Sanz, J., Ryan, T. A., Sher, R., Hess, S. T., & Gosse, J. A. (2018). Antimicrobial agent triclosan disrupts mitochondrial structure, revealed by super-resolution microscopy, and inhibits mast cell signaling via calcium modulation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 349, 39–54. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.04.005>
- Wei, L., Qiao, P., Shi, Y., Ruan, Y., Yin, J., Wu, Q., & Shao, B. (2017). Triclosan/triclocarban levels in maternal and umbilical blood samples and their association with fetal malformation. *Clinica Chimica Acta*, 466, 133–137. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.12.024>
- Welshons, W. V., Thayer, K. A., Judy, B. M., Taylor, J. A., Curran, E. M., & Vom Saal, F. S. (2003). Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environmental Health Perspectives*, 111(8), 994–1006. <https://doi.org/10.1289/ehp.5494>
- Westfall, C., Flores-Mireles, A. L., Robinson, J. I., Lynch, A. J. L., Hultgren, S., Henderson, J. P., & Levin, P. A. (2019). The Widely Used Antimicrobial Triclosan Induces High Levels of Antibiotic Tolerance *In Vitro* and Reduces Antibiotic Efficacy up to 100-

- Fold *In Vivo. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(5), e02312-18.
<https://doi.org/10.1128/AAC.02312-18>
- Witorsch, R. J. (2014). Critical analysis of endocrine disruptive activity of triclosan and its relevance to human exposure through the use of personal care products. *Critical Reviews in Toxicology*, 44(6), 535–555.
<https://doi.org/10.3109/10408444.2014.910754>
- Wloga, D., & Gaertig, J. (2010). Post-translational modifications of microtubules. *Journal of Cell Science*, 123(20), 3447–3455. <https://doi.org/10.1242/jcs.063727>
- World Health Organization. (2002). *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors*.
- Wu, C., Spongberg, A. L., & Witter, J. D. (2009). Adsorption and Degradation of Triclosan and Triclocarban in Soils and Biosolids-Amended Soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4900–4905. <https://doi.org/10.1021/jf900376c>
- Xiao, C., Wang, J., & Zhang, C. (2023). Synthesis, Regulatory Factors, and Signaling Pathways of Estrogen in the Ovary. *Reproductive Sciences*, 30(2), 350–360. <https://doi.org/10.1007/s43032-022-00932-z>
- Xu, Z., Schaedel, L., Portran, D., Aguilar, A., Gaillard, J., Marinkovich, M. P., Théry, M., & Nachury, M. V. (2017). Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation. *Science*, 356(6335), 328–332. <https://doi.org/10.1126/science.aai8764>
- Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y., & Saitou, M. (2008). Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nature Genetics*, 40(8), 1016–1022. <https://doi.org/10.1038/ng.186>
- Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Elvin, J. A., Carino, C., Prasad, S. V., Skinner, S. S., Dunbar, B. S., Dube, J. L., Celeste, A. J., & Matzuk, M. M. (2001). Synergistic Roles of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 in Ovarian Function. *Molecular Endocrinology*, 15(6), 854–866. <https://doi.org/10.1210/mend.15.6.0662>
- Yang, L., Baumann, C., De La Fuente, R., & Viveiros, M. M. (2020). Mechanisms underlying disruption of oocyte spindle stability by bisphenol compounds. *Reproduction*, 159(4), 383–396. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0494>
- Yaşar, P., Ayaz, G., User, S. D., Güpür, G., & Muyan, M. (2017). Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(1), 4–20. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12006>
- Yi, K., Rubinstein, B., Unruh, J. R., Guo, F., Slaughter, B. D., & Li, R. (2013). Sequential actin-based pushing forces drive meiosis I chromosome migration and symmetry breaking in oocytes. *Journal of Cell Biology*, 200(5), 567–576. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211068>

- Yildirim, R. M., & Seli, E. (2024). The role of mitochondrial dynamics in oocyte and early embryo development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 159–160, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2024.01.007>
- Ying, Y., Qi, X., & Zhao, G.-Q. (2001). Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(14), 7858–7862. <https://doi.org/10.1073/pnas.151242798>
- Younglai, E., Wu, Y., & Foster, W. (2007). Reproductive Toxicology of Environmental Toxicants: Emerging Issues and Concerns. *Current Pharmaceutical Design*, 13(29), 3005–3019. <https://doi.org/10.2174/138161207782110499>
- 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. <https://doi.org/10.1002/jcp.22171>
- Zama, A. M., & Uzumcu, M. (2009). Fetal and Neonatal Exposure to the Endocrine Disruptor Methoxychlor Causes Epigenetic Alterations in Adult Ovarian Genes. *Endocrinology*, 150(10), 4681–4691. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0499>
- Zhang, D.-X., Park, W.-J., Sun, S.-C., Xu, Y.-N., Li, Y.-H., Cui, X.-S., & Kim, N.-H. (2011). Regulation of Maternal Gene Expression by MEK/MAPK and MPF Signaling in Porcine Oocytes During In Vitro Meiotic Maturation. *Journal of Reproduction and Development*, 57(1), 49–56. <https://doi.org/10.1262/jrd.10-087H>
- Zhang, S.-X., Ding, Z.-M., Ahmad, M. J., Wang, Y.-S., Duan, Z.-Q., Miao, Y.-L., Xiong, J.-J., & Huo, L.-J. (2020). Bisphenol B Exposure Disrupts Mouse Oocyte Meiotic Maturation in vitro Through Affecting Spindle Assembly and Chromosome Alignment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 616771. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.616771>
- Zhang, Y., Zhang, Z., Xu, X., Li, X., Yu, M., Yu, A., Zong, Z., & Yu, B. (2008). Protein kinase a modulates Cdc25B activity during meiotic resumption of mouse oocytes. *Developmental Dynamics*, 237(12), 3777–3786. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21799>
- Zhao, H.-C., Ding, T., Ren, Y., Li, T.-J., Li, R., Fan, Y., Yan, J., Zhao, Y., Li, M., Yu, Y., & Qiao, J. (2016). Role of *Sirt3* in mitochondrial biogenesis and developmental competence of human *in vitro* matured oocytes. *Human Reproduction*, 31(3), 607–622. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev345>
- Zhou, W., Liu, J., Liao, L., Han, S., & Liu, J. (2008). Effect of bisphenol A on steroid hormone production in rat ovarian theca-interstitial and granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 283(1–2), 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.10.010>
- Zhu, Z.-Y., Chen, D.-Y., Li, J.-S., Lian, L., Lei, L., Han, Z.-M., & Sun, Q.-Y. (2003). Rotation of Meiotic Spindle Is Controlled by Microfilaments in Mouse Oocytes1. *Biology of Reproduction*, 68(3), 943–946. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.009910>

- Zhuang, S., Zhang, J., Wen, Y., Zhang, C., & Liu, W. (2012). Distinct mechanisms of endocrine disruption of DDT-related pesticides toward estrogen receptor α and estrogen-related receptor γ . *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(11), 2597–2605. <https://doi.org/10.1002/etc.1986>
- Zuccotti, M., Giorgi Rossi, P., Martinez, A., Garagna, S., Forabosco, A., & Redi, C. A. (1998). Meiotic and Developmental Competence of Mouse Antral Oocytes. *Biology of Reproduction*, 58(3), 700–704. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.3.700>
- Žalmanová, T., Hošková, K., Nevoral, J., Adámková, K., Kott, T., Šulc, M., Kotíková, Z., Prokešová, Š., Jílek, F., Králíčková, M., & Petr, J. (2017). Bisphenol S negatively affects the meiotic maturation of pig oocytes. *Scientific Reports*, 7(1), 485. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00570-5>
- Žalmanová, T., Hošková, K., Nevoral, J., Prokešová, Š., Zámotná, K., Kott, T., & Petr, J. (2016). Bisphenol S instead of bisphenol A: A story of reproductive disruption by regrettable substitution - a review. *Czech Journal of Animal Science*, 61(10), 433–449. <https://doi.org/10.17221/81/2015-CJAS>
- Žalmanová, T., Hošková, K., Prokešová, Š., Nevoral, J., Jeřeta, M., Benc, M., Yi, Y.-J., Moravec, J., Močáryová, B., Martínková, S., Fontana, J., Elkalaf, M., Trnka, J., Žáková, J., & Petr, J. (2023). The bisphenol S contamination level observed in human follicular fluid affects the development of porcine oocytes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1145182. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1145182>