

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni



Autoreferát disertační práce

**Vliv vybraných environmentálních polutantů na gametogenezi a časný
embryonální vývoj**
**The influence of selected environmental pollutants on gametogenesis and early
embryonic development**

Ing. Tereza Fenclová

Plzeň 2020

Abstrakt

Idiopatická infertilita je vážným problémem dnešní doby, který může být způsoben expozicí endokrinními disruptory, mezi které patří bisfenoly. Bisfenol A, nejvíce používaný bisfenol, je nyní kvůli prokázané toxicitě nahrazován ve výrobních procesech svými analogy, bisfenolem S a F. Zatímco většina prací se zaobírá vlivem toxických dávek po přímé expozici, tato studie přináší výsledky pro expozici reálnými nízkými dávkami po přímé i nepřímé expozici. Předpokládali jsme negativní vliv přímé i nepřímé expozice nízkými dávkami alternativních bisfenolů BPS a BPF na samčí i samičí reprodukci na úrovni gamet a embryí. Cílem práce je zhodnotit vliv přímé expozice na myší oocyty a spermie, zhodnotit vliv nepřímé expozice prostřednictvím mateřského mléka na myší oocyty, spermie, testikulární tkáň a přesah poškození do časného embryonálního vývoje. Pokusné laboratorní myši kmene ICR byly vystaveny nízkým dávkám bisfenolů přímo prostřednictvím pitné vody nebo orální sondy, anebo nepřímo prostřednictvím mateřského mléka. Přímá expozice nízkými dávkami bisfenolů ovlivnila reprodukční schopnosti samic zejména malformacemi dělicího vřeténka oocytů, snížením stability genomu a epigenetickými modifikacemi během meiotického zrání oocytů. Podobné projevy byly pozorovány i u expozice nepřímé prostřednictvím mateřského mléka. Byl pozorován zvýšený výskyt malformací dělicího vřeténka oocytů, pokles markerů heterochromatinu a zhoršení vývojové kompetence oocytů. U samců dochází při přímé expozici ke snížení motility spermií, nárůstu acetylace proteinů spermií a zvýšenému výskytu dvouřetězcových zlomů DNA v testikulární tkáni. Nepřímá expozice prostřednictvím mateřského mléka u samců zvyšuje výskyt dvouřetězcových zlomů DNA ve spermiích, a toto poškození je přenášeno po oplození do zygot a následně blastocyst. Výsledky naznačují, že možným mechanismem negativního účinku je poškození hemotestikulární bariéry a následně spermiogeneze. Tyto výsledky poukazují na fakt, že alternativní bisfenoly nejsou bezpečnou náhradou, a tak i tyto bisfenoly jsou příčinou idiopatické neplodnosti u obou pohlaví. Mimoto naše práce přináší poznatky o určení kvality gamet a mechanismech, které předurčují úspěšnost časného embryonálního vývoje.

Summary

Idiopathic infertility is a serious problem, which can be caused by exposure to endocrine disruptors, e.g. bisphenols. Bisphenol A, the most widely used bisphenol, is now being replaced in manufacturing processes due to its toxicity by its analogues, bisphenol S and F. While most of the scientific experiments examine the effect of toxic doses after direct exposure, this study provides results for exposure to real low doses after direct and indirect exposure. We assumed a negative effect of direct and indirect exposure to low doses of alternative bisphenols BPS and BPF on male and female reproduction at the level of gametes and embryos. The aim of this work is to evaluate the effect of direct exposure to mouse oocytes and sperm, to evaluate the effect of indirect exposure through breast milk to mouse oocytes, sperm, testicular tissue and the extent of damage to early embryonic development. Experimental ICR laboratory mice were exposed to low doses of bisphenols directly via drinking water or an oral gavage, or indirectly through the breast milk. Direct exposure to low doses of bisphenols affects the reproductive abilities of females mainly by malformations of the dividing spindle of oocytes, reduced genome stability and epigenetic modifications during meiotic maturation of oocytes. Similar manifestations are observed with indirect exposure via breast milk, such as increased oocyte's dividing spindle malformations, decreased markers of heterochromatin, and decreased developmental competence of oocytes. In males, direct exposure reduces sperm motility, increases protein acetylation and increases DNA double-stranded breaks in testicular tissue. Indirect exposure via breast milk increases the incidence of DNA double-stranded breaks in spermatozoa, and this damage is transmitted by fertilization to zygotes and subsequently to blastocysts. The results indicate that the possible mechanism of the negative effect is damage to the hemotesticular barrier and subsequently spermiogenesis. These results also indicate, that alternative bisphenols are not safe replacement and can be a cause of idiopathic infertility in both sexes. In addition, our work provides knowledge about the quality of gametes and the mechanisms that determine the success of early embryonic development.

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Hypotézy a cíle práce.....	8
2.1	Hypotéza.....	8
2.2	Cíle práce.....	8
3	Materiál a metodika	9
3.1	Etické zásady.....	9
3.2	Chemikálie.....	9
3.3	Experimentální zvířata a chovné podmínky.....	9
3.4	Přímá expozice	9
3.4.1	Přímá expozice samců.....	9
3.4.2	Přímá expozice samic.....	9
3.5	Expozice mateřským mlékem.....	9
3.6	Izolace oocytů a jejich <i>in vitro</i> maturace.....	10
3.7	Izolace zralých oocytů.....	10
3.8	Partenogenetická aktivace oocytů	10
3.9	Výplach embryí a jejich <i>in vitro</i> kultivace	11
3.10	Analýza spermií.....	11
3.11	Test struktury chromatinu spermií (SCSA)	11
3.12	Elektroforéza (ELFO) a Western Blot (WB).....	11
3.13	Histologie.....	12
3.14	Imunofluorescence.....	12
3.15	Imunocytochemie.....	12
3.16	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) 13	
3.17	Statistické vyhodnocení	13
4	Výsledky.....	14
4.1	Přímá expozice nízkými dávkami BPS ovlivňuje kvalitu myších oocytů.....	14
4.2	Nízké dávky BPS ovlivňují kvalitu myších spermií prostřednictvím post-translačních modifikací proteinů.....	15
4.3	Expozice bisfenoly prostřednictvím mateřského mléka jako možná příčina idiopatické infertility samic.....	16
4.4	Idiopatická infertilita samců způsobená expozicí bisfenolů prostřednictvím mateřského mléka.....	17
4.5	Idiopatická infertilita je způsobená vlivem BPS na testikulární tkáň.....	19
	Diskuse	21
	Závěry.....	25
	Použitá literatura.....	26

Přehled publikační činnosti autora 36

1 Úvod

Infertilita, tedy neplodnost, je v dnešní době problémem až 15% párů snažících se o početí (Bracke et al. 2018), kdy mužská a ženská infertility je v populaci zastoupena rovnoměrně (Szkodziak et al. 2020). U 30 – 40 % případů infertility u mužů je etiologie nejasná, jedná se tedy o idiopatickou infertilitu (Bracke et al. 2018). U žen se diagnóza idiopatické infertility vyskytuje u více než 25 % případů (Klein et al. 2021).

Možnou příčinou idiopatické infertility mohou být mimo jiné i environmentální kontaminanty s estrogenní anebo anti-androgenní aktivitou (Shi et al. 2017). Mezi tyto polutanty patří i endokrinní disruptory, konkrétně bisfenoly (Glausius 2014; Eladak et al. 2015; Rahman et al. 2015). Bisfenoly jsou běžně používané k výrobě plastických hmot, papíru, plechovek a dalších produktů denní spotřeby (Simoneau et al. 2011a; Wong a Durrani 2017a). Dříve nejvíce rozšířený a používaný bisfenol A (BPA) je v dnešní době kvůli prokázané toxicitě i v nízkých dávkách (Eladak et al. 2015; Vandenberg et al. 2012) nahrazován svými analogy, zejména bisfenolem S (BPS) a F (BPF) (Eladak et al. 2015; Shi et al. 2019), které jsou předmětem mnoha studií, včetně této práce.

Bisfenoly se do lidského těla dostávají především konzumací jídla z plechovek a pitím vody z plastových lahví (Shi et al. 2019). Takovouto expozici označujeme jako přímou. Neméně významný dopad na lidské zdraví lze pozorovat i u expozice nepřímé, například prenatální přes placentu (Salian et al. 2011; Munoz-de-Toro et al. 2005; Shi et al. 2017; Ullah et al. 2019a; Kundakovic et al. 2013) nebo perinatální prostřednictvím mateřského mléka (Nevoral et al. 2021; Fenclová et al. 2022).

V této práci se věnuji vlivu přímé i nepřímé expozice alternativními bisfenoly na reprodukční schopnosti samic i samců myší. Reprodukční schopnosti jsou měřeny kvalitou gamet a následně také jejich vývojovou kompetencí, tedy úspěšností časného embryonálního vývoje. Předložené komentované studie tedy přináší nejen poznatek negativního vlivu alternativního bisfenolu, ale zejména popis mechanismu negativních účinků endokrinních disruptorů ve velmi nízkých dávkách. Téma environmentálních polutantů, v čele s disruptory, jakými jsou bisfenoly, je v dnešní době rapidního nárůstu idiopatické infertility a subfertility v populaci velmi významné, a tak jsou předkládané práce robustním základem pro svědomité hodnocení látek s potenciálem endokrinní disrupce.

2 Hypotézy a cíle práce

2.1 Hypotéza

Přímá i nepřímá expozice bisfenoly S a F negativně ovlivňuje gametogenezi a tím i časný embryonální vývoj.

2.2 Cíle práce

1. Zhodnotit vliv přímé expozice nízkými dávkami BPS na kvalitu myších oocytů
2. Zhodnotit vliv přímé expozice nízkými dávkami BPS na kvalitu myších spermií
3. Zhodnotit vliv expozice BPS a BPF prostřednictvím mateřského mléka na kvalitu ovariální tkáně a oocytů u myši
4. Zhodnotit vliv expozice BPS a BPF prostřednictvím mateřského mléka na kvalitu testikulární tkáně, spermií a časný embryonální vývoj u myši
5. Zhodnotit vliv expozice BPS prostřednictvím mateřského mléka na vývoj testikulární tkáně a hemotestikulární bariéry

3 Materiál a metodika

3.1 Etické zásady

Všechny experimenty na zvířatech byly provedeny v souladu se zákonem o ochraně zvířat proti týrání (č. 246 / 1992 Sb.) pod dohledem Poradního výboru pro dobré životní podmínky na Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, ID schválení MSMT-11925/2016-3.

3.2 Chemikálie

Použité chemikálie, včetně BPS (CAS: 80-09-1, katalogové číslo 103039) byly zakoupeny od společnosti Merck (St. Luis, MO, Spojené státy americké) a Abcam (Cambridge, UK), pokud není uvedeno jinak.

3.3 Experimentální zvířata a chovné podmínky

Myši byly chovány v intaktních polysulfonátových klecích s 12–ti hodinovým cyklem světlo/tma, při teplotě 21 ± 1 °C a relativní vlhkosti 60 %. Ultračistá voda ve skleněných lahvích byla měněna dvakrát týdně. Dieta bez fytoestrogenů (1814P, Altromin, Německo) byly poskytnuty *ad libitum*. Pokusná zvířata byla alespoň týden před zahájením experimentů aklimatizována.

3.4 Přímá expozice

3.4.1 Přímá expozice samců

Pro experiment byli použiti dospělí samci outbredního kmene laboratorní myši ICR ve věku 8–16 týdnů. Zvířata byla vystavena BPS prostřednictvím pitné vody po dobu 8 týdnů (8. – 16. týden věku). BPS bylo rozpuštěno v 100 % etanolu a tento zásobní roztok byl nadále 1000x ředěn do pitné vody. Finální koncentrace BPS tak dosahovala hodnot: 0,0038, 3,8 a 380 ng na ml (BPS1, BPS2 a BPS3). S ohledem na denní spotřebu pitné vody a evidovanou hmotnost experimentálních zvířat byly předpokládány následující dávky: 0,001, 1 a 100 ng na g tělesné hmotnosti a den (Bachmanov et al. 2002). Kontrolní skupina byla vystavena vehikulu (tj. 0,1% ethanol v pitné vodě). Samci byli po dokončení expozice zváženi a usmrceni cervikální dislokací za účelem sběru vzorků spermií a testikulární tkáně.

3.4.2 Přímá expozice samic

Dospělé outbrední ICR myši samice vystaveny BPS v dávkách 0.001, 0.1, 10, a 100 ng na g tělesné hmotnosti a den (BPS1, BPS2, BPS3 a BPS4). Kontrolní skupina byla vystavena vehikulu (0,1% ethanol). BPS byl rozpuštěn v 50 μ l 50 % glycerolu s obsahem 0,1 % dimethylsulfoxidu a podáván denně po dobu sedmi dnů orální sondou. Po období expozice byly myši usmrceny cervikální dislokací.

3.5 Expozice mateřským mlékem

Dospělé šest až sedm týdnů staré outbrední ICR myši byly spářeny v estrální fázi a po porodu exponovány BPS a BPF skrze pitnou vodu v koncentracích 0,375 ng na ml (nízká dávka

BPS, nízká dávka BPF) a 37,5 ng na ml (střední dávka BPS, střední dávka BPF) od porodu (PND 0) do 15. dne života mláďat (PND 15). Kontrolní skupina byla vystavena vehikulu (0,1% ethanol), 0,375 ng na ml dávka diethylstilbestrolu (nízká dávka DES) byla požitá jako pozitivní kontrola. Dávky byly zvoleny na základě známého biologického působení (Nevoral et al. 2018a; Prokešová et al. 2020) a odpovídající expozici lidí v reálném životě (Rochester a Bolden 2015). Po zaznamenání množství zkonsumované pitné vody a tělesné hmotnosti kojících samic, byla určena skutečná BPS a BPF expozice těchto samic, 0,216 ng na g tělesné hmotnosti a den a 21,6 ng na g tělesné hmotnosti a den. Potomci byli odstaveni 21. den po narození (PND 21) a následně chováni individuálně ve standardních podmínkách až do dosažení reprodukční zralosti. Samčí mláďata byla usmrcena cervikální dislokací ve věku 15 dní (PND 15), 21 dní (PND 21) nebo 90 dní (PND 90). Samičí mláďata byla usmrcena cervikální dislokací ve věku 15 dní (PND 15) nebo 60 dní (PND 60).

3.6 Izolace oocytů a jejich *in vitro* maturace

Samice ve věku 8. - 12. týdnů byly po přímé expozici BPS usmrceny cervikální dislokací nebo hormonálně stimulovány PMSG. Po 48 hod. byly stimulované samice usmrceny cervikální dislokací za účelem izolace ovárií. Plně dorostlé nezralé oocyty ve stádiu zárodečného váčku byly z folikulů izolovány destrukcí ovariální tkáně pomocí jehly 27G. v médiu M2 (Merck, St. Luis, MO, Spojené státy americké, katalogové číslo MR-015-D) doplněném o 100 μ M isobutyl-methylxanthin (IBMX) (Merck, St. Luis, MO, Spojené státy americké, katalogové číslo 28822-58-4), inhibitor meiotického zrání oocytů (Grøndahl et al. 1998). Oocyty byly umístěny do kultivačního média M16 (Merck, St. Luis, MO, Spojené státy americké, katalogové číslo MR-016-D) s IBMX a ponechány po dobu alespoň 1 hodiny při 37 °C a 5 % CO₂. Poté byly oocyty fixovány v 4 % paraformaldehydu, doplněném 0,1% polyvinylalkoholem, po dobu 30 minut při laboratorní teplotě a skladovány při 4 °C do dalšího použití. Alternativně byly získané oocyty použity pro *in vitro* zrání v kultivačním médiu M16 po dobu 16 hodin při 37 °C a 5 % CO₂. Oocyty s vyděleným pólovým tělískem byly shledány jako dozrálé. Tyto oocyty byly fixovány a skladovány, jak je popsáno výše.

3.7 Izolace zralých oocytů

Samice myši kmene ICR byly ve věku 8. – 12. týdnů hormonálně stimulovány PMSG a o 48 hod. později hCG. Po dalších 16. hod. byly samice usmrceny cervikální dislokací a následovala izolace *in vivo* dozrálých oocytů. Ovulované komplexy kumulus-oocyt byly vypláchnuty z izolovaných vejcovodů a ošetřeny 0,1 % hyaluronidázou po dobu 5 min.za účelem odstranění kumulárních buněk. Pouze vitální oocyty s vyděleným pólovým tělískem byly nadále fixovány v 4 % paraformaldehydu a skladovány při 4 °C do dalšího použití.

3.8 Partenogenetická aktivace oocytů

In vivo dozrálé oocyty izolované z vejcovodů samic ICR byly aktivovány 10 mM SrCl₂ v modifikovaném kultivačním médiu KSOM (Merck Millipore, Burlington, MA, Spojené státy americké, katalogové číslo MR-121-D,) doplněném 0,1 % hovězím sérovým albuminem (BSA), 2 mM EGTA, a 5 μ g na ml cytochalasinu B, v podmínkách 37 °C a 5 % CO₂. Embrya byla následně kultivována v KSOM s BSA po dobu dalších 24 a 96 hod. do stádia 2buněčného embrya, resp. blastocysty.

3.9 Výplach embryí a jejich *in vitro* kultivace

Myši samice ICR ve věku 8. – 12. týdnů byly použity jako dárkyně embryí. Samice byly stimulovány pomocí PMSG a hCG, jak je popsáno výše. Po následném zapaštění prověřeným samcem byly samice usmrčeny cervikální dislokací a jednobuněčné zygoty byly izolovány z vejcovodu do 0,1 % hyaluronidázy. Po odstranění kumulárních buněk byly zygoty fixovány v 4 % formaldehydu po dobu 30 min. a následně uskladněny ve 4 °C k dalšímu použití. Alternativně byly zygoty kultivovány *in vitro* dalších 96 hod. v modifikovaném KSOM médiu, v podmínkách 37 °C a 5 % CO₂. Na konci kultivace embryí byl zaznamenán počet blastocyst a blastocysty byly fixovány v 4 % paraformaldehydu a skladovány při 4 °C k dalšímu použití.

3.10 Analýza spermií

Pokusným samcům byly odebrány ocasy nadvarlat, které byly disektovány v 0,5 ml Whittenova média a spermiím byl ponechán čas k vyplavání 30 minut. Koncentrace a motilita spermií byla poté hodnocena za pomoci přehřáté Maklerovy komůrky a světelného mikroskopu (Olympus CKX 41; Německo) vybaveného deseti objektivovými čočkami (CAchN NA 0,25). Do Maklerovy komůrky bylo napipetováno 10 µl suspenze spermií. Průměrná koncentrace spermií (miliony na mililitr) byla počítána ve třech liniích, každá o deseti čtvercích, a vydělena třemi. Současně byla každá spermie v počítané oblasti identifikována jako pohyblivá nebo nepohyblivá. Motilita spermií byla vyjádřena jako procento pohyblivých spermií z celkového počtu. Analýza byla prováděna jednou osobou, aby se předešlo zkreslení výsledků.

3.11 Test struktury chromatinu spermií (SCSA)

SCSA byl proveden podle již dříve popsaného protokolu (Evenson a Jost 2000). Tato technika je založena na zranitelnosti spermatozoální DNA vůči denaturaci vyvolané kyselinou *in situ* a následném metachromatickém barvení akridinovou oranží. Hodnotil se index fragmentace DNA (DFI) lrb% a vysoká barvitelnost DNA (HDS) lrb%, indikátory nezralosti chromatinu (tj. úplnosti protaminace). Vzorky byly hodnoceny pomocí FACSVerse Flow Cytometer (BD Biosciences) kontrolovaného pomocí BD FACSuite. U každého vzorku bylo zaznamenáno 5 000 událostí. Excitace akridinové oranže byla provedena modrým laserem (488 nm); červená fluorescence byla detekována pomocí filtru 700/54 BP a zelená fluorescence byla detekována pomocí filtru 537/32 BP. Data byla analyzována pomocí WEASEL Ver. 3 (WEHI).

3.12 Elektroforéza (ELFO) a Western Blot (WB)

ELFO a WB byly provedeny na lyzátu testikulární tkáně a spermií experimentálních samců. Testikulární tkáň byla lyzována v radioimunoprecipitačním pufru obohaceném o kompletní koktejl proteázových inhibitorů (Roche, Švýcarsko). Vzorky hlaviček spermií byly připraveny sonikací a lýzou v radioimunoprecipitačním pufru doplněném 100mM DTT. Následně byla změřena koncentrace proteinů pomocí bicinchoniové kyseliny (Olson 2016; Lovrien a Matulis 2005). Poté byly vzorky smíchány s Laemmliho nanášecím pufrem doplněným β-merkptoethanolem. Pro elektroforézu na dodecylsulfátovém polyakrylamidovém gelu byly použity 4–15% separační Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gely (Bio-Rad, Francie); kdy do každé gelové komůrky bylo loadováno 30 µg testikulárních proteinů nebo 60 µg proteinů spermií. Pro Western blotting byl použit Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, Francie). Polyvinylidendifluoridové membrány (Bio-Rad, Francie) byly blokovány v 5 % hovězím sérovém albuminu v TBS s 0,5% Tween-20 po dobu 60 minut při 21±1 °C a inkubovány přes noc při 4 °C s primárními protilátkami

zředěnými v 1 % hovězím sérovém albuminu v TBS s 0,5 % Tween-20. Králičí polyklonální anti- α -tubulinová protilátka (1:1 000; Cell Signaling, Spojené státy americké, katalogové číslo 2144;) byla použita jako srovnávací protilátka. Sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (kozí anti-myší nebo anti-králičí IgG; 1:15 000; Invitrogen, Spojené státy americké) byly aplikovány po dobu 1 hodiny při $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Cílené proteiny byly vizualizovány pomocí ECL Select Western blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, Spojené království) a membrány byly skenovány na systému ChemiDocTM MP (Bio-Rad, Francie). Snímky membrán byly zpracovány pomocí softwaru ImageLab 4.1 (Bio-Rad, Francie).

3.13 Histologie

Tkáň k histologické analýze byla fixována v Bouinově fixačním médiu, následně dehydratována a zalita do parafínu. Tkáň v parafinových bločcích byla nařezána na 10 μm tlusté řezy, které byly po odstranění vosku a rehydrataci barveny hematoxylinem a eosinem. Následně byly histologické řezy hodnoceny pod světelným mikroskopem.

3.14 Imunofluorescence

K imunobarvení byly 10 μm silné histologické řezy zbaveny vosku a rehydratovány. Nespecifická vazebná místa byla blokována roztokem 5 % normálního kozího séra (NGS) a 0,1% TritonX-100 a 0,5% Tween 20 ve fosfátem pufrovaném fyziologickém roztoku (PBS-TT) po dobu 60 min. při $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Následně byly řezy inkubovány s primární protilátkou (1:200) přes noc při 4°C . Nespecifická vazba sekundární protilátky byla testována vynecháním specifických primárních protilátek a tato sklíčka byla zpracována stejným postupem. Po promytí v roztoku PBS-TT obsahujícím 1 % NGS byla sklíčka inkubována po dobu 40 minut s PNA lektinem (1:400; Alexa Fluor 488, Abcam, Spojené království) a odpovídající sekundární protilátkou (anti-myší nebo anti-králičí Alexa Fluor 647, Abcam, Spojené království) ředěnou 1:500 v PBS-TT obsahující 1 % NGS. Sklíčka byla zamontována pomocí Vectashield média s 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories Inc., Spojené státy americké) k barvení jader. Snímky byly získány pomocí konfokálního mikroskopu s rotujícím diskem Olympus IX83 (Olympus, Německo) a softwaru VisiView (Visitron Systems GmbH, Německo). Vzniklé snímky byly analyzovány pomocí ImageJ software (NIH, Spojené státy americké).

3.15 Imunocytochemie

Fixované oocyty nebo zygoty byly permeabilizovány v PBS obsahujícím 0,04 % TritonX-100 a 0,3 % Tween-20 po dobu 15 minut při 37°C . Vzorky byly poté blokovány v 1 % hovězím sérovém albuminu v PBS s Tween-20 po dobu 15 minut a inkubovány s koktejlem protilátek (1:200) po dobu 1 hodiny při $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Nespecifická vazba sekundárních protilátek byla testována vynecháním specifických primárních protilátek a tato sklíčka byla zpracována stejným postupem. Po promytí byly vzorky inkubovány s koktejlem sekundárních protilátek Alexa Fluor 488 a 647 (1:200). Do promývacího roztoku byl přidán faloidin (1:200; kat. č. #13054; Thermo Fisher Scientific, Spojené státy americké) kvůli vizualizaci β -aktinu. Obarvené vzorky byly upevněny na sklíčka pomocí média Vectashield s DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, Spojené státy americké). Snímky byly získány pomocí konfokálního mikroskopu s rotujícím diskem Olympus IX83 (Olympus, Německo) a softwaru VisiView (Visitron Systems GmbH, Německo). Snímky byly hodnoceny pomocí softwaru ImageJ (NIH, Spojené státy americké).

3.16 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL)

Analýza TUNEL byla provedena za účelem analýzy dvouřetězcových zlomů DNA. Fixované vzorky byly permeabilizovány v 0,1 % Tritonu X-100 v PBS obsahujícím 0,05 % NaN₃ po dobu 40 minut. Poté byly ošetřeny fluoresceinem konjugovaným dUTP a enzymem terminální deoxyribonukleotidyltransferázou (In situ Cell Death Detection Kit, kat. č. 11684795910, Roche, Německo) po dobu 1 hodiny ve tmě při 37 °C. Pozitivní kontrola byla připravena pomocí soupravy DNase I (AMP-D1, Sigma-Aldrich, Spojené státy americké). Nakonec byly vzorky upevněny na sklíčka Vectashield médiem s DAPI (Vector Laboratories Inc., Spojené státy americké). Intenzita signálu byla měřena pomocí softwaru ImageJ (National Institutes of Health, Spojené státy americké).

3.17 Statistické vyhodnocení

Data byla analyzována pomocí GraphPad Prism 8.1.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, Spojené státy americké). Na základě Shapiro-Wilkových testů distribuce normality byly rozdíly testovány pomocí běžné jednosměrné analýzy rozptylu, po které následoval Tukeyho vícenásobný test. Alternativně byly pro nenormálně distribuovaná data použity Kruskal-Wallisovy a Dunnovy *post hoc* testy. P-hodnoty <0,05, 0,01, 0,001 a 0,0001 byly považovány za statisticky významné a označeny hvězdičkami (*), (**), (***) a (****). Alternativně, křížky indikovaly rozdíly od pozitivní kontroly (low DES) (#, ##, ###, respektive ####). Normálně a nenormálně distribuovaná data jsou vyjádřena jako průměr a medián.

4 Výsledky

4.1 Přímá expozice nízkými dávkami BPS ovlivňuje kvalitu myších oocytů

V této studii jsme předpokládali negativní vliv endokrinního disruptoru bisfenolu S (BPS) na kvalitu myších oocytů po přímé *in vivo* expozici samic. Cílem této studie bylo posoudit změny cytoskeletární, kvality chromatinu a změny transkriptomu v oocytech po přímé *in vivo* expozici širokým rozsahem subtoxických dávek BPS. Jako donorky oocytů byly použity dospělé samice laboratorní myši kmene ICR. Oocyty byly analyzovány prostřednictvím metody TUNEL, imunocytochemie a qRT-PCR.

Přímá expozice nízkými dávkami BPS neovlivnila počet izolovaných oocytů ve stádiu zárodečného váčku (GV – germinal vesicle), kvalitu chromatinové konfigurace, ani počet dozrálých oocytů a meiotické kompetence, nicméně u zralých oocytů ošetřených BPS byly sledovány morfologické abnormality na dělicím vřeténku včetně nekonjugovaných tubulů. Vyskytla se též dvojité metafázní vřeténka a poruchy v zarovnání chromozómů v metafázní destičce. V GV oocytech byl pozorován nárůst metylace DNA (5meC), markeru heterochromatinu, a dimethylace histonu H3 (H3K27me2), markeru stability genomu. Rovněž u zralých oocytů byl pozorován nárůst 5meC po expozici BPS, zatímco H3K27me2 nevykazoval statisticky významný rozdíl. Vzhledem ke změnám chromatinových markerů nezralých GV a zralých oocytů byl hodnocen účinek účinné dávky BPS na genovou expresi v GV oocytech. Byla zjištěna zvýšená exprese genů spojených s buněčným stresem (zejména *Cldn34b2*, *Gsdmc2* a *Batf3*) po expozici BPS. Pozorovali jsme rovněž změny ve faktorech souvisejících s embryonálním vývojem, zejména exprese markerů preimplantačního embryonálního vývoje *Ceacam10*, *Hist1h2af*, *Tmal16* a *Raptor*, byla zvýšená.

Závěrem lze tvrdit, že expozice BPS významně ovlivňuje kvalitu oocytů prostřednictvím tvorby vřeténka, stability genomu a epigenetických modifikací během meiotického zrání. Mimoto, expozice BPS ovlivňuje transkripční profil v nezralých GV oocytech, kdy zejména transkripty buněčného stresu a následného embryonálního vývoje podléhají signifikantním změnám.

Na této práci jsem se podílela provedením obrazové analýzy oocytů po imunocytochemické analýze.

4.2 Nízké dávky BPS ovlivňují kvalitu myších spermií prostřednictvím post-translačních modifikací proteinů

V další práci jsme předpokládali negativní vliv přímé expozice endokrinního disruptoru BPS na jedince experimentálních myších samců. Cílem bylo analyzovat kvalitu spermií a testikulární tkáň u myších samců po přímé expozici nízkými dávkami BPS. Vedle dosud známých mechanismů účinku endokrinních disruptorů (tj. hormonální disbalance, případně toxický efekt) jsme testovali dopad BPS na post-translační modifikace proteinů testis a spermií.

Po 8 týdnech přímé expozice nízkými dávkami BPS byli myši samci usmrceni, zvaženi a byla jim odebrána varlata pro další proteomické analýzy. Spermie byly získány z nadvarlat odebraných ve stejnou dobu. Tkáň varlat byla hodnocena stereologicky, epigenetické změny testikulární tkáň a spermií byly sledovány pomocí metody western blot. Pro identifikaci a kvantifikaci proteinů testikulární tkáň a spermií byly použity metody hmotnostní spektrometrie nano-liquid chromatografie-MS (nano-LC-MS), resp. matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight (MALDI-TOF).

Nebyl zaznamenán statistický rozdíl mezi tělesnou hmotností ani relativní hmotností varlat, hladinami hormonů a koncentrací spermií mezi jednotlivými skupinami. Pozorovali jsme ovšem snížení počtu motilních spermií u vybrané skupiny BPS. Pro zjištění dopadu přímé expozice BPS na testikulární tkáň byla provedena stereologická analýza, která neprokázala vliv expozice BPS. Pro zjištění efektu BPS na spermatogenezi, byla identifikována jednotlivá stadia spermatogeneze semenotvorného epitelu a nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl mezi skupinami. Histopatologická analýza ale odhalila nárůst abnormalit, jako zvětšení multijaderných zárodečných buněk v testikulární tkáni u myši exponovaných nejvyšší dávkou BPS. Rovněž došlo ke snížení počtu zralých spermií v zárodečné vrstvě. Proteomickou analýzou testikulární tkáň nebyly prokázány rozdíly v acetyloemu a fosforyloemu testikulárních proteinů, nicméně byl zjištěn nárůst dvouřetězcových zlomů DNA, testovaných pomocí protilátky proti fosforylovanému histonu H2 (γ H2AX). Rovněž byla provedena analýza acetyloemu a fosforyloemu ve spermiích, kdy byl zjištěn nárůst acetylací u proteinů s molekulární vahou 37, 40 a 50 kDa a fosforylací u proteinů s molekulární vahou 37, 40, 85 a 100 kDa u samců exponovaných BPS. V souladu s předchozími zjištěními, která prokazují pokles motility spermií u exponované skupiny samců, můžeme předpokládat, že byly acetylovány cytoskeletální faktory, jako je tubulin. Pomocí specifické protilátky proti acetylovanému α -tubulinu však nebyl tento efekt prokázán.

Tato studie je mezi prvními, které prokazují škodlivost reálných nízkých dávek BPS na kvalitu savčích spermií. Protože je reálná expozice BPS u člověka mnohem nižší (0,004 μ g/kg tělesné hmotnosti/den), než se běžně testuje (Liao et al. 2012), naše výsledky přináší cenné poznatky o dalším možném způsobu účinku endokrinních disruptorů: modulace post-translačních modifikací proteinů. Lze se tak domnívat, že tyto změny mohou být příčinu idiopatické neplodnosti u mužů.

Na předložené publikaci jsem se podílela zejména na proteomických analýzách spermií a testikulární tkáň pomocí metody western blot.

4.3 Expozice bisfenoly prostřednictvím mateřského mléka jako možná příčina idiopatické infertility samic

Po prozkoumání účinku BPS na kvalitu oocytů, testikulární tkáně a spermií při přímé expozici, jsme se zaměřili na expozici nepřímou prostřednictvím mateřského mléka. Předpokládali jsme negativní efekt BPS na ovariální rezervu a kvalitu oocytů především na intracelulární úrovni, tj. na úrovni epigenetických markerů heterochromatinu a malformace dělicího vřeténka. Dalším předpokladem byla snížená schopnost vývoje oocytů do stádia blastocyst. Cílem práce bylo zhodnotit vliv expozice BPS a BPF prostřednictvím mateřského mléka na kvalitu ovariální tkáně, ovariální zásobu, kvalitu oocytů a jejich vývojové kompetence do stádia blastocyst.

Pokusné kojící samice myšího kmene ICR byly exponovány BPS nebo BPF prostřednictvím pitné vody. Tímto jsme simulovali expozici potomků mateřským mlékem, v našem modelu do 15. postnatálního dne (PND15), kdy dochází výhradně k příjmu mateřského mléka. Kontrolní skupina kojících samic byla napájena vehikulem, tj. 0,1 % etanolem. Po ukončení expozice byly samice potomků usmrceny cervikální dislokací v 15. den věku (PND15), samice jiných vrhů byly dále chovány a usmrceny cervikální dislokací v den dosažení reprodukčního vrcholu ve věku 60 dní (PND60). Jejich ovaria byla použita pro histologickou a stereologickou analýzu. Alternativně jsme izolovali nezralé oocyty (GV) a ty následně kultivovali *in vitro*. Zralé oocyty byly použity pro imunocytochemickou analýzu. Stejně tak oocyty dozralé *in vivo* byly analyzovány pomocí imunocytochemie nebo použity pro partenogenetickou aktivaci a kultivovány do stádia blastocyst.

Nebyl prokázán rozdíl mezi kontrolními a exponovanými samicemi v četnosti primordiálních folikulů v juvenilním stádiu ani v počtech primárních, preantrálních, antrálních či atretických folikulů v dospělosti. Mimoto, jiné samice v proestru/estru byly použity jako dárkyně nezralých oocytů ve stádiu zárodečného váčku (GV – germinal vesicle), které byly kultivovány *in vitro* do stádia zralých oocytů. Alternativně, hormonálně stimulované samice ovulovaly *in vivo* dozralé oocyty. Expozice bisfenoly neovlivnila počet GV oocytů získaných z ovaria ani schopnost znovu zahájit meiotické zrání (tj. GVBD, rozpad zárodečného váčku). Podobně u oocytů dozralých *in vivo* nebyl statisticky významný rozdíl v celkovém počtu oocytů, ani počtu atretických nebo fragmentovaných oocytů. Následně byl hodnocen mechanismus účinku bisfenolů na intracelulární úrovni. Pomocí imunobarvení α -tubulinu a dimetylace histonu H3 na lysinu K27 (H3K27me2) byl hodnocen cytoskelet a heterochromatin oocytů ovulovaných po hormonální stimulaci. Jako dárkyně vajíček byly použity samice v nativním cyklu říje ve fázi pro-/estru. Oocyty samic vystavených nízkým dávkám BPS a BPF vykazovaly zvýšený výskyt malformací dělicího vřeténka doprovázené poruchami v zarovnání chromozómů v metafázní destičce. Byla pozorována aberantní dělicí vřeténka, poruchy zarovnání chromozómů i epigenetické změny heterochromatinu u oocytů dozralých *in vitro* i ovulovaných *in vivo*. *In vivo* dozralé oocyty byly dále použity pro posouzení vývojové kompetence do stádia blastocyst pomocí partenogenetické aktivace. Partenogenetická aktivace odhalila pokles ve vývojové kompetenci ovulovaných oocytů a to tak, že u skupin vystavených nízkým dávkám BPS jsme pozorovali selhání v dělení blastomer stejně jako snížený počet blastocyst.

Tato studie prokazuje, že expozice alternativními bisfenoly prostřednictvím mateřského mléka je možnou příčinou idiopatické infertility u žen v dospělosti. BPS i BPF mají škodlivé účinky na oocyty během perinatálního expozičního okna, kdy se významným způsobem rozhoduje o kvalitě oocytu uplatněné v dospělosti.

Na této práci jsem se podílela provedením analýzy obrazu oocytů po imunocytochemické analýze.

4.4 Idiopatická infertilita samců způsobená expozicí bisfenolů prostřednictvím mateřského mléka

Stejně jako u samic, idiopatická infertilita dospělých samců může být způsobena vystavením škodlivému vlivu bisfenolů v období perinatálního vývoje mléčné výživy. Předpokládali jsme změny v testikulární tkáni, sníženou kvalitu spermií, hlavně vyšší výskyt dvouřetězcových zlomů DNA, které po oplození ovlivní i kvalitu časného embryonálního vývoje. Cílem této studie bylo posoudit vliv laktační expozice BPS a BPF na samčí reprodukční schopnosti, tedy na kvalitu testikulární tkáně, spermií, ale také na časný embryonální vývoj embryí po oplození oocytů spermiemi exponovaných samců.

Pokusné kojící samice myšního kmene ICR byly exponovány BPS nebo BPF prostřednictvím pitné vody. Tímto jsme simulovali expozici potomků mateřským mlékem, v našem modelu do 15. postnatálního dne (PND15), kdy dochází výhradně k příjmu mateřského mléka. Kontrolní skupina kojících samic byla napájena vehikulem, tj. 0,1 % etanolem. Jako pozitivní kontrola byla použita nízká dávka diethylstilbestrolu (DES). Po odstavu byly myši samci chováni do dosažení dospělosti, kdy byli použity k přirozenému připouštění samic; tyto samice se staly donorkami zygot, které byly vypláchnuty z vejcovodů *post mortem* a kultivovány do stádia blastocyst *in vitro*. Nakonec byli pokusní samci usmrceni cervikální dislokací a byly izolovány jejich spermie a testikulární tkáň. Tento materiál byl dále hodnocen pomocí imunofluorescence a western blotu.

Expozice bisfenoly neměla efekt na hmotnost samců po odstavu ani u dospělců, avšak estrogení účinek bisfenolů, vyjádřený pomocí změn anogenitální vzdálenosti, byl pozorován u samců vystaveným nízkým dávkám BPS. Nebyly zjištěny žádné rozdíly v motilitě a koncentraci spermií mezi skupinami, stejně jako v indexu fragmentace DNA a míry dekonenzace chromatinu spermií. Dále byl hodnocen vliv bisfenolů na histonový kód u dospělých samců, který mohl být poškozen v citlivém expozičním oknu vývoje zárodečných spermatogonií. Byly zkoumány dva epigenetické markery stability chromatinu a DNA poškození – dimetylace lysinu K4 na histonu H3 (H3K4me2), resp. fosforylace histonu H2 (γ H2AX) u samců exponovaných BPS. Byl pozorován nárůst H3K4me2 v testikulární tkáni u skupiny exponované střední dávkou BPS, avšak γ H2AX nevykazoval žádné rozdíly. Stejně markery byly posouzeny i u spermií, kde nebyly zjištěny žádné rozdíly. Nicméně byl pozorován nárůst γ H2AX loci v samčích prvojádrech zygot po oplození oocytů spermiemi samců exponovaných bisfenoly. Podobně schopnost vývoje do blastocyst výrazně poklesla u skupiny samců exponované středními dávkami BPS. Přestože nebyly prokázány žádné rozdíly v počtu blastomer těchto blastocyst, byl zaznamenán nárůst DNA zlomů v blastomerách. Data získaná v jednotlivých experimentech byla použita pro stanovení korelací mezi jednotlivými parametry. Zajímavé negativní korelace byly zjištěny mezi H3K4me2 v testikulárních zárodečných buňkách a dělením časných embryí, a také dvouřetězcovými zlomy DNA v blastocystách. Významná pozitivní korelace byla zjištěna mezi γ H2AX ve spermiích a γ H2AX loci v paternálních prvojádrech. Je zřejmé, že kvalita testikulární tkáně a spermií je úzce spjata s kvalitou časného embryonálního vývoje a blastocyst.

Tato studie potvrzuje, že expozice bisfenoly prostřednictvím mateřského mléka v citlivém perinatálním období ovlivňuje kvalitu testikulární tkáně samců a tím i jejich spermie v dospělosti, kdy spermie své poškození přenášejí do zygoty a časného embrya. Tato zjištění mohou být odpovědí na příčinu idiopatické neplodnosti u mužů, která může mít svůj původ již v období mléčné výživy.

Na předložené publikaci jsem se podílela experimentálním designem, hodnocením kvality testikulární tkáně a spermií pomocí metody western blot, analýzou dosažených výstupů pomocí densitometrie. Můj podíl byl rovněž v podobě vyhodnocení výsledků, příprava výstupů,

interpretace nálezů a psaní rukopisu. V autorském kolektivu jsem zastala úlohu korespondujícího autora.

4.5 Idiopatická infertilita je způsobená vlivem BPS na testikulární tkáň

Tato studie navazuje na předchozí a je zaměřená na hodnocení testikulární tkáně u samců vystavených účinkům BPS prostřednictvím mateřského mléka. Protože testikulární tkáň hraje klíčovou roli ve správném vývoji spermií, předpokládali jsme po expozici bisfenoly negativní změny právě v testikulární tkáni. Očekávali jsme především poškození hemotestikulární bariéry, komponenty nezbytné pro zajištění optimálního prostředí pro spermatogenezi, která je utvářena v kritickém období perinatálního vývoje, kdy bisfenoly mohou ovlivnit její formování a funkci v dospělosti. Cílem práce bylo zhodnotit kvalitu testikulární tkáně, složení hemotestikulární bariéry a posouzení míry oxidativního stresu v testikulární tkáni u myších samců exponovaných mateřským mlékem.

Pokusné kojící samice myšího kmene ICR byly exponovány BPS nebo BPF prostřednictvím pitné vody. Tímto jsme simulovali expozici potomků mateřským mlékem, v našem modelu do 15. postnatálního dne (PND15), kdy dochází výhradně k příjmu mateřského mléka. Kontrolní skupina kojících samic byla napájena vehikulem, tj. 0,1% etanolem. Jako pozitivní kontrola byla použita nízká dávka diethylstilbestrolu (DES). Samci byli usmrceni cervikální dislokací v 15. dni života (PND15) nebo v 90. dni života (PND90) a jejich varlata byla použita pro histopatologické a imunohistochemické analýzy, imunofluorescenční analýzy, TUNEL a western blot.

Pomocí histopatologické analýzy byla porovnávána kvalita testikulární tkáně u mladých (PND15) a dospělých (PND90) samců. U mladých ani dospělých samců nebyl prokázán žádný statistický rozdíl v počtu poškozených semenotvorných kanálků. Dále byly zkoumány kvantitativní znaky testikulární tkáně dospělých samců. Průměr semenotvorných kanálků nevykazoval žádné rozdíly, avšak došlo k výraznému snížení zárodečného epitelu testikulární tkáně u samců vystavených středním dávkám BPS. Podobně nebyl prokázán rozdíl v poměru semenotvorných kanálků v různých stádiích spermatogeneze (I – IV, IV – VI, VII – XII). V semenotvorných kanálcích nebyly zaznamenány rozdíly v počtech pachytenních a leptotenních spermatocytů ani v počtu kulovitých spermatid. Pomocí analýzy TUNEL nebyl prokázán žádný rozdíl mezi jednotlivými skupinami, stejně tak γ H2AX, marker dvoušroubovicových zlomů DNA, nevykázal žádné rozdíly. Mimo markerů epigenetické kvality a integrity chromatinu jsme se zaměřili na hemotestikulární bariéru pomocí proteinového markeru connexin 43 (CX43). Zatímco u mladých samců nebyly pozorovány žádné rozdíly mezi pokusnými skupinami a kontrolními, u dospělců byl prokázán nárůst oblasti výskytu CX43 u samců exponovaných střední dávkou BPS. Pro hodnocení těsných spojů imunofluorescencí byly použity protilátky proti occludinu 11 (OCL11) a proti *zonula occludens 1* proteinu (ZO1). Byl pozorován nárůst OCL u skupin vystavených nízké dávce BPS, a také podstatný nárůst ZO1 u obou pokusných skupin. Těsné spoje byly testovány jen u dospělých samců (PND90). Mimo markerů hemotestikulární bariéry byl prokázán nárůst oxidativního stresu, měřeného 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu (8OHdG) v mitochondriích, zatímco cytoplazmatické ukazatele heat shock protein 90 (HSP90) a peroxiredoxin 6 (PRDX6) zůstaly bez změny.

Stejně jako předchozí studie, i tato práce prokazuje negativní vliv expozice BPS prostřednictvím mateřského mléka na reprodukční schopnosti samců v dospělosti. Oproti předešlé práci, která popisuje důsledky selhávání, přináší tato studie poznatky o možném mechanismu, kterým bisfenoly v testikulární tkáni působí. Mimoto jsme touto studií přispěli pochopení kinetiky bisfenolů prostupujících mateřským mlékem matky do organismu sajících potomků.

Na předložené publikaci jsem se podílela na designování experimentů, hodnocením testikulární tkáně pomocí analýzy western blot, imunofluorescence, vyhodnocení výsledků těchto analýz densitometrií, resp. obrazovou analýzou. Též jsem se podílela na extrakci BPS ze vzorků mateřského mléka a žaludečních obsahů potomků. Výsledky jsem zpracovala a

interpretovala pro účely rukopisu, kterým jsem sepsala a v současné době odeslala do redakce časopisu. Také v tomto případě plním úlohu korespondujícího autora.

Diskuse

Bisfenoly jsou rozšířené endokrinní disruptory běžně používané k výrobě mnoha produktů denní spotřeby, jako jsou plastické hmoty, epoxidové pryskyřice, recyklovaný papír, papír pro termální tiskárny, plechovky či polykarbonáty (Rosenmai et al. 2014; Wang et al. 2015; Simoneau et al. 2011b; Wong a Durrani 2017b). Použití BPA, u něž byly prokázány toxické účinky, je legislativně regulováno (EFSA 2015), a proto dochází k jeho nahrazování pomocí různých analogů, zejména BPS. Výrobky tak získají status „BPA free“, ačkoli obsahují jiný endokrinní disruptor, jehož použití není zatím právně ošetřeno. Výskyt BPS v prostředí a lidských tělních tekutinách je v dnešní době srovnatelný s výskytem BPA (Wu et al. 2018; Karrer et al. 2020), proto je nutné podrobit BPS přísnému vědeckému zkoumání a zjištění negativních účinků na lidské zdraví. Protože jsou lidé každodenně vystaveni nízkým dávkám BPS, který přestože je rychle metabolizován a vylučován močí (Skledar et al. 2016), jsou tak vystaveni chronickému působení vlivu BPS. Dopad BPS na zdraví člověka je zjevný, bisfenoly byly označeny za obesogeny, ve vyšších dávkách za látky toxické a v nízkých dávkách za hormonální disruptory. Pokud však dochází k poškození či ovlivnění reprodukčních schopností, může se řada změn v gametách odrazit ve snížené schopnosti reprodukce a/nebo nepřímo přenášet změny na své potomky (Shi et al. 2019b). Reprodukční schopnosti člověka jsou jednou z mnoha oblastí, které BPS negativně ovlivňuje jak při expozici přímé tak nepřímé.

Prokázali jsme negativní vliv akutní přímé expozice BPS na samičí reprodukci (Prokešová et al. 2020), kdy jsme pozorovali nepravidelné uspořádání mikrotubulů v dělicím vřeténku oocyty a chybné zarovnání chromozómů v metafázní destičce. Toto pozorování podporuje estrogenní účinek BPS popsáný dříve (Beker-Van Woudenberg et al. 2004). BPS se vyznačuje také epigenetickým účinkem, což bylo potvrzeno zvýšením metylace DNA (5meC) ve zralých MII oocytech a zvýšením dimethylace histonu H3 (H3K27me2) v nezralých GV oocytech. Tyto výsledky se shodují s dříve pozorovaným účinkem BPA na metylaci histonů v oocytech (Trapphoff et al. 2013; Wang et al. 2016), avšak epigenetický účinek BPS vykazuje rozdíly při akutní a chronické expozici (Nevoral et al. 2018a). Naše výsledky poukazují, že BPS moduluje epigenetický kód, čímž se může zapojit také do genové exprese gamet v dřívějších fázích oo-/spermatogeneze, obdobně jako BPA (Verbanck et al. 2017). Změny v epigenetickém kódu po expozici disruptory následně mohou nejen přetrvat po celý život, ale také mohou být přeneseny na potomstvo tzv. inter- a transgenerační dědičností (Walker 2016).

Přímá expozice BPS negativně ovlivnila také samčí reprodukci prostřednictvím posttranslačních modifikací (PTMs) (Řimnáčová et al. 2020). Protože dozralé spermie jsou transkripčně neaktivní, jsou za regulaci proteinové aktivity zodpovědné PTMs, například acetylace a fosforylace lysinu jsou nezbytné pro správnou funkci spermií (Naz a Rajesh 2004; Ritagliati et al. 2018). Ve snaze popsat mechanismus negativního účinku bisfenolů, který byl popsán na samčí reprodukci již dříve (Naz a Rajesh 2004; Rahman et al. 2017; Ritagliati et al. 2018; Peknicová et al. 2002) jsme předpokládali, že právě PTMs jsou ovlivňovány a modifikovány těmito polutanty. Myši samci byli vystaveni účinkům BPS prostřednictvím pitné vody po dobu 8 týdnů, což pokrývá celý proces spermatogeneze včetně ustanovení kódu v podobě PTMs. Opravdu, v lyzátu spermií samců vystavených působení BPS byly detekovány změny proteinové acetylace a fosforylace, které jsou spojeny s úspěšnou kapacitou a fertilizační schopností spermií (O'Flaherty et al. 2004; Ritagliati et al. 2018). Tento nálezný je pravděpodobnou příčinou snížení motility spermií, neboť aberantní acetylace a/nebo

fosforylace mohou být zodpovědné za poruchy pohyblivosti spermií (Nakamura et al. 2008; Mariappa et al. 2010). Snížení fosforylací tyrosinu naznačuje nedostatek aktivity proteinu hexokinázy-1, která je spojována s mužskou neplodností (Olds-Clarke et al. 1996). Naše zjištění podporují dřívějšími poznatky o účinku BPA na fosforylaci proteinů ve spermiích (Rahman et al. 2015).

Neméně významná je nepřímá expozice bisfenoly. Ve své práci se věnuji zejména nepřímé expozici prostřednictvím mateřského mléka. Důvodem jsou skutečnosti, že potomci vystavení vlivu bisfenolů prostřednictvím mateřského mléka nemají ještě plně vyvinutý detoxikační mechanismus jater a ledvin (Matalová et al. 2016), mateřské mléko je jejich výhradním potravním zdrojem a environmentální polutanty (většinou rozpustné v tucích) mohou být v mateřském mléce více koncentrované. Jen několik studií se zabývá expozicí bisfenoly prostřednictvím mateřského mléka (Balci et al. 2022; Ozkemahli et al. 2022; LaPlante et al. 2017; Li et al. 2016), ačkoli poporodní období je jedním z nejcitlivějších pro vývoj reprodukčních orgánů a buněk. Tento fakt je dalším důvodem volby tohoto způsobu expozice – časné juvenilní období považujeme za expoziční okno, které vede v dospělosti k tzv. idiopatické neplodnosti, tj. bez zjevné příčiny.

Pro účel studia jsme vytvořili model laboratorní myši exponované prostřednictvím mateřského mléka kojící samice. Na základě tohoto modelu vzniklo několik studií, první z nich se zabírala hodnocením dopadu bisfenolů na samičí reprodukci (Nevoral et al. 2021). V oocytech dospělých samic exponovaných během mléčné výživy byly analyzovány cytoskeletární a epigenetické markery. Cílem bylo odhalit změny v oocytech dospělých samic po expozici nízkými dávkami bisfenolů, neboť perinatální období je vysoce citlivé k zachování integrity DNA oocytů (Stringer et al. 2020) a epigenetickým změnám vedoucím k transgenerační dědičnosti (Pocar et al. 2017a; 2012). Dosažené výsledky dokazují negativní efekt na cytoskelet oocytů a dělicí vřeténko. Byly pozorovány také perzistující astrální mikrotubuly v ooplasmě zralých oocytů, která lze pozorovat v nezralých oocytech (Verlhac et al. 1993). Tyto částice lze považovat za nedegradovaný pericentriolární materiál nebo za prekursor centrozómů v oogoniích (Sathananthan et al. 2000; Simerly et al. 2018). Kromě toho byla struktura dělicích vřetének podobná té, která byla pozorována po nadměrné polymeraci tubulinu doprovázené rozšířením vřeténka a přítomností astrálních mikrotubulů vycházejících z pólů vřeténka a/nebo cytoplazmatických ložisek, nalezených v kryokonzervovaných oocytech (Tamura et al. 2013). Přesto tato odchylka nemá souvislost aneuploidii (Forman et al. 2012) a tento fenotyp je zjevně dopadem expozice bisfenoly na primární oocyty během perinatálního expozičního okna, zatímco se tvoří primordiální folikuly (Niu a Spradling 2020). Pro posouzení epigenetických změn byl zvolen marker ustanovení a stability heterochromatinu, H3K27me₂. Byl skutečně prokázán pokles H3K27me₂ u oocytů dozrálých in vitro, což naznačuje potlačení ustanovení heterochromatinu, důležitého pro DNA integritu v oocytech (Nevoral et al. 2018b). Mimoto předpokládáme, že také další epigenetické značky jsou ovlivněny a komplexní změna epigenetického kódu v gametách může vést k modulaci epigenetické paměti a/nebo alteracím v genomu imprintingu, přičemž tato poškození jsou přenášena do dalších generací (Manikkam et al. 2013; Pocar et al. 2017b). Tyto výsledky jsou podpořeny i histologickými analýzami ovariální tkáně. Zatímco počet folikulů nebyl ovlivněn, interakce se somatickými buňkami nedokázala zachránit kvalitu oocytů, jak bylo popsáno v jiných studiích (Li et al. 2008). Toto zjištění je v souladu s faktem, že granulózní buňky se diferencují a utvářejí právě v prvních dnech perinatálního života (Niu a Spradling 2020). Ačkoli in vivo ovulované oocyty podléhají přirozené selekci na ovariu podle kvality

dělicího vřeténka a metafázní destičky (Hornak et al. 2011; 2012), po expozici bisfenoly vykazovaly i in vivo ovulované oocyty poškození právě těchto struktur. Dokonce i vývojová kompetence, měřená úspěšností časného embryonálního vývoje po partenogenetické aktivaci, byla u těchto oocytů negativně ovlivněna expozicí BPS. Tento výsledek potvrzuje dříve publikovanou práci popisující cytoskeletární a epigenetické poškození myších oocytů samic nepřímo exponovaných BPS odlišným způsobem: gestační expozice gravidní matky (Zhang et al. 2020). Na základě námi dosažených výsledků a dosavadního poznání lze nepřímou expozici endokrinními disruptory označit za nebezpečnou pro samičí reprodukci, která se s problémy potýká mnohem později, než dochází k expozici těmito látkami.

Nepřímá expozice bisfenoly prostřednictvím mateřského mléka negativně ovlivňuje také samčí reprodukci (Fenclová et al. 2022). Nedošlo k poškození základních parametrů spermioqramu jako je motilita a koncentrace, což je v souladu s dřívějším pozorováním (Ullah et al. 2019). Na druhou stranu, přímá expozice BPS tento efekt přinesla a měla za následek snížení motility (Římnáčová et al. 2020). Z toho lze usuzovat, že motilita spermií je ovlivněna způsobem expozice a/nebo věkem exponovaného jedince. Jednotlivé bisfenoly mohou též zřejmě působit různými způsoby (Shi et al. 2017; Ullah et al. 2018). Myší samci byli exponováni bisfenoly v citlivém období, kdy dochází k diferenciaci zárodečných buněk testikulární tkáně a jejich dynamickým epigenetickým modifikacím (Nakata et al. 2015; Ernst et al., 2011). Pomocí markerů DNA poškození, γ H2AX a H3K4me2 (Wang et al. 2020; Zhang et al. 2022), byly posouzeny epigenetické změny testikulární tkáně a spermií. U spermií H3K4me2 slouží jako marker nezralosti (Štiavnická et al. 2019) a indikuje nedostatečné nahrazení histonů protaminy, což má za následek poruchy kondenzace heterochromatinu (Rahman et al. 2017). V testikulární tkáni může nahromadění H3K4me2 vést až ke sterilitě (Katz et al. 2009) a naše studie potvrzuje zvýšení H3K4me2 v testikulární tkáni i spermiích po expozici BPS prostřednictvím mateřského mléka. Naopak marker dvouřetězcových zlomů DNA a DNA integrity γ H2AX (Derijck et al. 2006; Kuo a Yang 2008; Sharma et al. 2012) nevykazoval očekávané zvýšení. Byla však pozorována zajímavá korelace mezi γ H2AX ve spermiích, paternálních prvojádrech zygot a v blastocystách. Z toho lze usuzovat, že poškození DNA je přenášeno dokonce již od spermatogonií testikulární tkáně do spermatid a spermií (Olsen et al. 2005). Vskutku další studie prokázaly přenos poškození spermatozoální DNA do časného embrya (Casanovas et al. 2019; Middelkamp et al. 2019; Rajabi et al. 2018; Sedó et al. 2017; Wyck et al. 2018). Nicméně, naše zjištění přináší poznatky, že tento přenos ovlivňuje natolik časnou zygotu, že předurčuje úspěšnost jejího dalšího embryonálního vývoje. Zjistili jsme, že podobně jako γ H2AX, i H3K4me2 je transferován ze spermií do paternálních prvojader. Paternální prvojádra s vyšším výskytem poškození DNA vykazují opožděnou replikaci DNA nutnou pro fúzi prvojader (Gawecka et al. 2013), přičemž opravné mechanismy DNA se u myši aktivují až s aktivací embryonálního genomu ve fázi dvoubuněčného embrya (Lepikhov et al. 2011) a do té doby závisí oprava DNA paternálního prvojádra zygoty na oocytární zásobě proteinů a RNA (Newman et al. 2022). Naše studie, zabývající se kvalitou spermií samců exponovaných bisfenoly v perinatálním období prostřednictvím mateřského mléka, přinesla poznatky o vlivu na epigenetickou kvalitu testikulární tkáně, spermií i časného embryonálního vývoje po oplození oocytů těmito spermiemi.

Vzhledem k výše popsaným nálezům, kdy dochází zjevně k poškození germinálních buněk spíše než zrajících spermatocytů a spermií, jsme uvažovali poškození hemotestikulární bariéry (blood-testis barrier, BTB), která pozdější vývojová stádia spermioogeneze ochraňuje. Pro ověření naší hypotézy poškození BTB po perinatální expozici byla navržena histologická

studie testikulární tkáně (Fenclová et al., under review), která přirozeně doplňuje naše dřívější poznatky. V kritickém období perinatálního vývoje totiž dochází k vytváření BTB, komponenty zodpovídající za správný průběh spermatogeneze. BTB omezuje paracelulární tok látek ze Sertoliho buněk (bazálního kompartmentu) do apikálního kompartmentu, kde probíhá post-meiotický vývoj zárodečných buněk (Yan Cheng a Mruk 2012). BTB je také důležitá pro obnovu spermatogonií, jejich mitotickou proliferaci a diferenciaci (Yan Cheng a Mruk 2012; Zhou a Wang 2022). Spermatogonie mají plný přístup k nutrientům, hormonům a dalším biomolekulám (včetně toxinů) z testikulárních cév v intersticiu varlat, zatímco vyvíjející spermatidy jsou chráněny BTB (Yan Cheng a Mruk 2012; Cheng et al. 2011). Preleptotenní spermatidy musí prostoupit BTB do apikálního kompartmentu testikulární tkáně, aby mohly zahájit meiotické dělení (Wen et al. 2018). Těsné (tight) a mezerové (gap) spoje jsou hlavními komponentami BTB. Pro posouzení mezerových spojů byl zvolen marker Connexin 43 (CX43) (Li et al. 2010; Pointis a Segretain 2005; Steger et al. 1999; Yawer et al. 2022; 2020), který vykázal nárůst v testikulární tkáni dospělých samců exponovaných prostřednictvím mateřského mléka v perinatálním období. U juvenilních samců nebyly prokázány žádné rozdíly. Toto zjištění může být vysvětleno tím, že BTB se utváří od první spermatogenní vlny na začátku puberty, dokud není ukončena proliferace Sertoliho buněk (Gerber et al. 2016). CX43 je důležitý protein pro remodelaci BTB během spermatogeneze v dospělosti (Li et al. 2010), proto lze předpokládat, že zvýšení CX43 je spojené se zvýšenou nutností oprav mezerových spojů v BTB (Mruk a Cheng 2015; Cheng et al. 2011; Yan Cheng a Mruk 2012). Markery těsných spojů, zonula occludens 1 (ZO-1) a occludin 11 (OCL) (Li et al. 2010; Hill et al. 2018; Mita et al. 2011) též vykázaly nárůst v BTB po expozici bisfenoly prostřednictvím mateřského mléka. Tento výsledek je v rozporu se dřívějším zjištěním poklesu těsných spojů u orálně exponovaných prepubertálních myší (Cao et al. 2020) a krys (Tian et al. 2017), avšak toto poškození bylo reverzibilní u zvířat vystavených nízkým dávkám bisfenolů. Kromě poškození BTB vyvolává expozice bisfenoly prostřednictvím mateřského mléka zvýšení mitochondriálního oxidativního stresu v testikulární tkáni v dospělosti, což potvrzují i dřívější studie (Richter 1992; Suzuki et al. 1999; Kaimal et al. 2021).

Na základě našich výsledků lze vyvodit závěr, že BPS a BPF nejsou bezpečnou alternativou BPA. Přímá expozice nízkými dávkami BPS negativně ovlivňuje kvalitu oocytů i spermií exponovaných jedinců. Jinak tomu není ani u expozice nepřímé prostřednictvím mateřského mléka. Dokonce i nízké dávky přijímané matkou poškozují proces oogeneze u samičích a spermatogeneze u samčích potomků. U samců je nepřímou expozicí ovlivněn i vývoj testikulární tkáně a formování BTB. Poškození testikulární tkáně vyústí v poškození spermatogeneze a spermie tyto negativní změny přenáší při oplození do zygoty, což má za následek selhávání časného embryonálního vývoje. Lze tvrdit, že expozice alternativními bisfenoly je možnou příčinou idiopatické infertility u obou pohlaví.

Závěry

Endokrinní disruptory jsou v dnešní době závažným problémem zapříčiňujícím infertilitu žen i mužů. V případě některých endokrinních disruptorů není jejich použití regulováno, přestože je známa jejich škodlivost. Jiné endokrinní disruptory zůstávají stále neproověřeny. Proto se tato práce zabývá bisfenoly BPS a BPF, které představují alternativu k dříve hojně využívanému BPA, jehož toxicita byla plně prokázána. Přestože přibývá důkazů o škodlivosti BPS a BPF, přičemž mnoho z nich přinesly předložené práce, jejich používání při výrobě plastických hmot, plechovek, termálního papíru a dalších produktů denní spotřeby není nijak regulováno. Zde komentované původní práce studují dopad BPS a BPF na reprodukci a popisují mechanismy, jakým jako endokrinní disruptory působí.

Náš výzkum splnil všechny cíle této práce a potvrdil hypotézy o škodlivosti alternativních bisfenolů BPS a BPF. Přímá expozice na experimentální samice myši negativně ovlivnila kvalitu myších oocytů, zejména tvorbu dělicího vřeténka, stabilitu genomu a epigenetické modifikace během meiotického zrání. Mimoto, expozice ovlivnila transkripční profil v nezralých GV oocytech, kdy zejména transkripty buněčného stresu a následného embryonálního vývoje podléhaly signifikantním změnám. U parametrů samčí reprodukce způsobila přímá expozice snížení motility, nárůst hladiny acetylace proteinů spermií a nárůst zlomů DNA v testikulární tkáni. Nepřímá expozice prostřednictvím mateřského mléka v období mléčné výživy způsobila v dospělosti samice malformace dělicího vřeténka, ovlivnila formování heterochromatinu a snížila vývojové kompetence myších oocytů. U samců tato nepřímá expozice negativně působila na stabilitu DNA spermií. Toto poškození bylo po oplození oocyty přeneseno do zygot a blastocyst. Poškození hemotestikulární bariéry bylo prokázáno po nepřímé expozici bisfenolům a je tak vysvětlením pro poškození spermií během spermatogeneze.

Závěrem lze tvrdit, že bisfenoly ovlivňují reprodukční schopnosti při přímé i nepřímé expozici, a fungují nejrůznějšími způsoby na reprodukční procesy samic a samců. Experimentální práci jsme prokázali změny epigenetického kódu, poškození cytoskeletu, integrity DNA a post-translačních modifikací proteinů. Přestože použité dávky byly velmi nízké, simulovaly experimenty právě reálné expozice člověka a výsledky tak lze považovat za alarmující ve vztahu k reprodukčnímu zdraví a příčinám neplodnosti. Další experimenty jsou zapotřebí k objasnění transgenerační dědičnosti změn chromatinu prostřednictvím epigenetického kódu způsobených expozicemi bisfenolům. Též je nezbytná striktní kontrola dopadů endokrinních disruptorů v reálných (tj. velmi nízkých) dávkách nejen na reprodukční schopnosti.

Použitá literatura

- BACHMANOV, Alexander A, Danielle R REED, Gary K BEAUCHAMP a Michael G TORDOFF, 2002. *Food Intake, Water Intake, and Drinking Spout Side Preference of 28 Mouse Strains*.
- BALCI, Aylin, Gizem ÖZKEMAHLI, Pınar ERKEKOGLU, Dilara ZEYBEK, Nilgün YERSAL a Belma KOCER-GUMUSEL, 2022. Effects of prenatal and lactational bisphenol a and/or di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on male reproductive system. *International Journal of Environmental Health Research* [online]. **32**(4), 902–915. ISSN 13691619. Dostupné z: doi:10.1080/09603123.2020.1805416
- BEKER-VAN WOUDEBERG, Anna R., Helena T.A. VAN TOL, Bernard A.J. ROELEN, Ben COLENBRANDER a Mart M. BEVERS, 2004. Estradiol and Its Membrane-Impermeable Conjugate (Estradiol-Bovine Serum Albumin) during In Vitro Maturation of Bovine Oocytes: Effects on Nuclear and Cytoplasmic Maturation, Cytoskeleton, and Embryo Quality. *Biology of Reproduction* [online]. **70**(5), 1465–1474. ISSN 00063363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod.103.025684
- BRACKE, An, Kris PEETERS, Usha PUNJABI, David HOOGEWIJS a Sylvia DEWILDE, 2018. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reproductive BioMedicine Online* [online]. **36**(3), 327–339. ISSN 14726491. Dostupné z: doi:10.1016/j.rbmo.2017.12.005
- CAO, Tingshuai, Yuanchao CAO, Hongqiang WANG, Peitao WANG, Xinsheng WANG, Haitao NIU a Cuihua SHAO, 2020. The Effect of Exposure to Bisphenol A on Spermatozoon and the Expression of Tight Junction Protein Occludin in Male Mice. *Dose-Response* [online]. **18**(2), 1–6. ISSN 15593258. Dostupné z: doi:10.1177/1559325820926745
- CASANOVAS, Aida, Jordi RIBAS-MAYNOU, Sandra LARA-CERRILLO, Ana Raquel JIMENEZ-MACEDO, Olga HORTAL, Jordi BENET, Joan CARRERA a Agustín GARCÍA-PEIRÓ, 2019. Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. *Fertility and Sterility* [online]. **111**(4), 699-707.e1. ISSN 15565653. Dostupné z: doi:10.1016/j.fertnstert.2018.11.035
- CHENG, C. Yan, Elissa W.P. WONG, Pearl P.Y. LIE, Michelle W.M. LI, Dolores D. MRUK, Helen H.N. YAN, Ka-Wai MOK, Jayakanthan MANNU, Premendu P. MATHUR, Wing-Yee LUI, Will M. LEE, Michele BONANOMI a Bruno SILVESTRINI, 2011. Regulation of blood-testis barrier dynamics by desmosome, gap junction, hemidesmosome and polarity proteins. *Spermatogenesis* [online]. **1**(2), 105–115. Dostupné z: doi:10.4161/spmg.1.2.15745
- DERIJCK, Alwin A.H.A., Godfried W. VAN DER HEIJDEN, Maud GIELE, Marielle E.P. PHILIPPENS, Casandra C.A.W. VAN BAVEL a Peter DE BOER, 2006. γ H2AX signalling during sperm chromatin remodelling in the mouse zygote. *DNA Repair* [online]. **5**(8), 959–971. ISSN 15687864. Dostupné z: doi:10.1016/j.dnarep.2006.05.043
- EFSA, 2015. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal* [online]. **13**(1). ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2015.3978
- ELADAK, Soria, Tiphany GRISIN, Delphine MOISON, Marie Justine GUERQUIN, Thierry N'TUMBA-BYN, Stéphanie POZZI-GAUDIN, Alexandra BENACHI, Gabriel LIVERA, Virginie ROUILLER-FABRE a René HABERT, 2015. A new chapter in the bisphenol a story: Bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and Sterility* [online]. **103**(1), 11–21. ISSN 15565653. Dostupné z: doi:10.1016/j.fertnstert.2014.11.005

- EVENSON, Donald a Lorna JOST, 2000. Sperm Chromatin Structure Assay for Fertility Assessment. *Current Protocols in Cytometry*. **13**(1), 1–27.
- ERNST, Linda, Eduardo RUCHELLI and Dale HUFF. (2011). Color Atlas of Fetal and Neonatal Histology. New York, NY: Springer-Verlag.
- FENCLOVÁ, Tereza, Hedvika ŘIMNÁČOVÁ, Marouane CHEMEK, Jiřina HAVRÁNKOVÁ, Pavel KLEIN, Milena KRÁLÍČKOVÁ a Jan NEVORAL, 2022. Nursing Exposure to Bisphenols as a Cause of Male Idiopathic Infertility. *Frontiers in Physiology* [online]. **13**(February). ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2022.725442
- FENCLOVÁ, Tereza, Marouane CHEMEK, Jiřina HAVRÁNKOVÁ, Yaroslav KOLINKO, Vendula SUDOVA, Jiří MORAVEC, Jana NAVRÁTILOVÁ, Pavel KLEIN, Milena KRÁLÍČKOVÁ a Jan NEVORAL. Effect of bisphenol S on testicular tissue after low-dose nursing exposure. *Environmental Pollution*. 2022 [cit. 2022-06-30]. Under review.
- FORMAN, Eric J., Xinying LI, Kathleen M. FERRY, Katherine SCOTT, Nathan R. TREFF a Richard T. SCOTT, 2012. Oocyte vitrification does not increase the risk of embryonic aneuploidy or diminish the implantation potential of blastocysts created after intracytoplasmic sperm injection: A novel, paired randomized controlled trial using DNA fingerprinting. *Fertility and Sterility* [online]. **98**(3), 644–649. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/j.fertnstert.2012.04.028
- GAWECKA, Joanna E., Joel MARH, Michael ORTEGA, Yasuhiro YAMAUCHI, Monika A. WARD a W. Steven WARD, 2013. Mouse Zygotes Respond to Severe Sperm DNA Damage by Delaying Paternal DNA Replication and Embryonic Development. *PLoS ONE* [online]. **8**(2). ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0056385
- GERBER, Jonathan, Julia HEINRICH a Ralph BREHM, 2016. Blood-testis barrier and Sertoli cell function: Lessons from SCCx43KO mice. *Reproduction* [online]. **151**(2), R15–R27. ISSN 17417899. Dostupné z: doi:10.1530/REP-15-0366
- GLAUSIUS, Josie, 2014. The Plastic Puzzle. *Nature*. **508**, 306–308.
- GRØNDAHL, Christian, Jan L. OTTESEN, Monika LESSL, Peter FAARUP, Anthony MURRAY, Frederik C. GRØNVALD, Christa HEGELE-HARTUNG a Ian AHNFELT-RØNNE, 1998. Meiosis-activating sterol promotes resumption of meiosis in mouse oocytes cultured in vitro in contrast to related oxysterols. *Biology of Reproduction* [online]. **58**(5), 1297–1302. ISSN 00063363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod58.5.1297
- HILL, Peter W.S., Harry G. LEITCH, Cristina E. REQUENA, Zhiyi SUN, Rachel AMOUROUX, Monica ROMAN-TRUFERO, Malgorzata BORKOWSKA, Jolyon TERRAGNI, Romualdas VAISVILA, Sarah LINNETT, Hakan BAGCI, Gopuraja DHARMALINGHAM, Vanja HABERLE, Boris LENHARD, Yu ZHENG, Sriharsa PRADHAN a Petra HAJKOVA, 2018. Epigenetic reprogramming enables the transition from primordial germ cell to gonocyte. *Nature* [online]. **555**(7696), 392–396. ISSN 14764687. Dostupné z: doi:10.1038/nature25964
- HORNAK, Miroslav, Michal JESETA, Petra MUSILOVA, Antonin PAVLOK, Michal KUBELKA, Jan MOTLIK, Jiri RUBES a Martin ANGER, 2011. Frequency of aneuploidy related to age in porcine oocytes. *PLoS ONE* [online]. **6**(4), 2–6. ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0018892
- HORNAK, Miroslav, Eva ORACOVA, Pavlina HULINSKA, Leona URBANKOVA a Jiri RUBES, 2012. Aneuploidy detection in pigs using comparative genomic hybridization: From the oocytes to blastocysts. *PLoS ONE* [online]. **7**(1), 1–6. ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0030335
- KAIMAL, Amrita, Maryam H. AL MANSI, Josephine Bou DAGHER, Catherine POPE, Marissa G. VARGHESE, Thomas B. RUDI, Ansley E. ALMOND, Loren A. CAGLE,

- Hermela K. BEYENE, William T. BRADFORD, Benjamin B. WHISNANT, Baobsom D.K. BOUGOUMA, Karim J. RIFAI, Yen Jun CHUANG, Elyssa J. CAMPBELL, Abhyuday MANDAL, Puliur S. MOHANKUMAR a Sheba M.J. MOHANKUMAR, 2021. Prenatal exposure to bisphenols affects pregnancy outcomes and offspring development in rats. *Chemosphere* [online]. **276**, 130118. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2021.130118
- KARRER, Cecile, Monica ANDREASSEN, Natalie VON GOETZ, Friederike SONNET, Amrit Kaur SAKHI, Konrad HUNGERBÜHLER, Hubert DIRVEN a Trine HUSØY, 2020. The EuroMix human biomonitoring study: Source-to-dose modeling of cumulative and aggregate exposure for the bisphenols BPA, BPS, and BPF and comparison with measured urinary levels. *Environment International* [online]. **136**(July 2019), 105397. ISSN 18736750. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2019.105397
- KATZ, David J, T Matthew EDWARDS, Valerie REINKE a William G KELLY, 2009. A C. elegans LSD1 Demethylase Contributes to Germline Immortality by Reprogramming Epigenetic Memory. *Cell* [online]. **137**(2), 308–320. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2009.02.015
- KLEIN, Martin, Lenka LAPIDES, Denisa FECMANOVA a Ivan VARGA, 2021. Novel cellular entities and their role in the etiopathogenesis of female idiopathic infertility-a review article. *Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology* [online]. **48**(3), 461–465. ISSN 03906663. Dostupné z: doi:10.31083/j.ceog.2021.03.2395
- KUNDAKOVIC, Marija, Kathryn GUDSNUK, Becca FRANKS, Jesus MADRID, Rachel L. MILLER, Frederica P. PERERA a Frances A. CHAMPAGNE, 2013. Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol a exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **110**(24), 9956–9961. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1214056110
- KUO, Linda J. a Li Xi YANG, 2008. γ -H2AX- A novel biomaker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*. **22**(3), 305–310. ISSN 0258851X.
- LAPLANTE, Charlotte D., Mary C. CATANESE, Ruby BANSAL a Laura N. VANDENBERG, 2017. Bisphenol S alters the lactating mammary gland and nursing behaviors in mice exposed during pregnancy and lactation. *Endocrinology* [online]. **158**(10), 3448–3461. ISSN 19457170. Dostupné z: doi:10.1210/en.2017-00437
- LEPIKHOV, Konstantin, Mark WOSSIDLO, Julia ARAND a Jörn WALTER, 2011. DNA methylation reprogramming and DNA repair in the mouse zygote. *International Journal of Developmental Biology* [online]. **54**(11–12), 1565–1574. ISSN 02146282. Dostupné z: doi:10.1387/ijdb.103206kl
- LI, Jing, Nan SHENG, Ruina CUI, Yixing FENG, Bing SHAO, Xuejiang GUO, Hongxia ZHANG a Jiayin DAI, 2016. Gestational and lactational exposure to bisphenol AF in maternal rats increases testosterone levels in 23-day-old male offspring. *Chemosphere* [online]. **163**, 552–561. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2016.08.059
- LI, Michelle W.M., Dolores D. MRUK, Will M. LEE a C. Yan CHENG, 2010. Connexin 43 is critical to maintain the homeostasis of the blood-testis barrier via its effects on tight junction reassembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **107**(42), 17998–18003. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1007047107
- LI, Qinglei, Laurie J. MCKENZIE a Martin M. MATZUK, 2008. Revisiting oocyte-somatic cell interactions: In search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence. *Molecular Human Reproduction* [online]. **14**(12), 673–678. ISSN 13609947. Dostupné z: doi:10.1093/molehr/gan064

- LIAO, Chunyang, Fang LIU, Husam ALOMIRAH, Vu Duc LOI, Mustafa Ali MOHD, Hyo Bang MOON, Haruhiko NAKATA a Kurunthachalam KANNAN, 2012. Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: Occurrence and human exposures. *Environmental Science and Technology* [online]. **46**(12), 6860–6866. ISSN 0013936X. Dostupné z: doi:10.1021/es301334j
- LOVRIEN, Rex a Daumantas MATULIS, 2005. Assays for Total Protein. *Current Protocols in Microbiology*. 1–14.
- MANIKKAM, Mohan, Rebecca TRACEY, Carlos GUERRERO-BOSAGNA a Michael K. SKINNER, 2013. Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, Reproductive Disease and Sperm Epimutations. *PLoS ONE* [online]. **8**(1). ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0055387
- MARIAPPA, Daniel, Ravindranath H. ALADAKATTI, Santosh K. DASARI, Arun SREEKUMAR, Michael WOLKOWICZ, Frans VAN DER HOORN a Polani B. SESHAGIRI, 2010. Inhibition of tyrosine phosphorylation of sperm flagellar proteins, outer dense fiber protein-2 and tektin-2, is associated with impaired motility during capacitation of hamster spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* [online]. **77**(2), 182–193. ISSN 1040452X. Dostupné z: doi:10.1002/mrd.21131
- MATALOVÁ, Petra, Karel URBÁNEK a Pavel ANZENBACHER, 2016. Specific features of pharmacokinetics in children. *Drug Metabolism Reviews* [online]. **48**(1), 70–79. ISSN 10979883. Dostupné z: doi:10.3109/03602532.2015.1135941
- MIDDELKAMP, Sjors, Helena T.A. VAN TOL, Diana C.J. SPIERINGS, Sander BOYMANS, Victor GURYEV, Bernard A.J. ROELEN, Peter M. LANSDORP, Edwin CUPPEN a Ewart W. KUIJK, 2019. Sperm DNA damage causes genomic instability in early embryonic development. *bioRxiv* [online]. (April), 1–13. Dostupné z: doi:10.1101/681296
- MITA, Payal, Barry T. HINTON a Jannette M. DUFOUR, 2011. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biology of Reproduction* [online]. **84**(5), 851–858. ISSN 00063363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod.110.087452
- MRUK, Dolores D. a C. Yan CHENG, 2015. The mammalian blood-testis barrier: Its biology and regulation. *Endocrine Reviews* [online]. **36**(5), 564–591. ISSN 0163769X. Dostupné z: doi:10.1210/er.2014-1101
- MUNOZ-DE-TORO, Monica, Caroline MARKEY, Perinaaz R. WADIA, Enrique H. LUQUE, Beverly S. RUBIN, Carlos SONNENSCHNEIN a Ana M. SOTO, 2005. Perinatal exposure to Bisphenol A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* [online]. **146**(9), 4138–4147. ISSN 00137227. Dostupné z: doi:10.1210/en.2005-0340
- NAKAMURA, Noriko, Antonio MIRANDA-VIZUETE, Kiyoshi MIKI, Chisato MORI a Edward M. EDDY, 2008. Cleavage of disulfide bonds in mouse spermatogenic cell-specific type 1 hexokinase isozyme is associated with increased hexokinase activity and initiation of sperm motility. *Biology of Reproduction* [online]. **79**(3), 537–545. ISSN 00063363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod.108.067561
- NAKATA, Hiroki, Tomohiko WAKAYAMA, Yoshimi TAKAI a Shoichi ISEKI, 2015. Quantitative Analysis of the Cellular Composition in Seminiferous Tubules in Normal and Genetically Modified Infertile Mice. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* [online]. **63**(2), 99–113. ISSN 15515044. Dostupné z: doi:10.1369/0022155414562045
- NAZ, Rajesh K. a Preeti B. RAJESH, 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology* [online]. **2**, 1–12. ISSN 14777827. Dostupné z: doi:10.1186/1477-7827-2-75

- NEVORAL, Jan, Jiřina HAVRÁNKOVÁ, Yaroslav KOLINKO, Šárka PROKEŠOVÁ, Tereza FENCLOVÁ, Ladan MONSEF, Tereza ŽALMANOVÁ, Jaroslav PETR a Milena KRÁLÍČKOVÁ, 2021. Exposure to alternative bisphenols BPS and BPF through breast milk: Noxious heritage effect during nursing associated with idiopathic infertility. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. **413**(September 2020). ISSN 10960333. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2021.115409
- NEVORAL, Jan, Yaroslav KOLINKO, Jiří MORAVEC, Tereza ŽALMANOVÁ, Kristýna HOŠKOVÁ, Šárka PROKEŠOVÁ, Pavel KLEIN, Kamar GHAIBOUR, Petr HOŠEK, Miriama ŠTIAVNICKÁ, Hedvika ŘIMNÁČOVÁ, Zbyněk TONAR, Jaroslav PETR a Milena KRÁLÍČKOVÁ, 2018a. Long-term exposure to very low doses of bisphenol S affects female reproduction. *Reproduction* [online]. **156**(1), 47–57. ISSN 17417899. Dostupné z: doi:10.1530/REP-18-0092
- NEVORAL, Jan, Yaroslav KOLINKO, Jiří MORAVEC, Tereza ŽALMANOVÁ, Kristýna HOŠKOVÁ, Šárka PROKEŠOVÁ, Pavel KLEIN, Kamar GHAIBOUR, Petr HOŠEK, Miriama ŠTIAVNICKÁ, Hedvika ŘIMNÁČOVÁ, Zbyněk TONAR, Jaroslav PETR a Milena KRÁLÍČKOVÁ, 2018b. Long-term exposure to very low doses of bisphenol S affects female reproduction. *Reproduction* [online]. **156**(1), 47–57. ISSN 17417899. Dostupné z: doi:10.1530/REP-18-0092
- NEWMAN, H., S. CATT, B. VINING, B. VOLLENHOVEN a F. HORTA, 2022. DNA repair and response to sperm DNA damage in oocytes and embryos, and the potential consequences in ART: a systematic review. *Molecular human reproduction* [online]. **28**(1), 1–14. ISSN 14602407. Dostupné z: doi:10.1093/molehr/gaab071
- NIU, Wanbao a Allan C. SPRADLING, 2020. Two distinct pathways of pregranulosa cell differentiation support follicle formation in the mouse ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **117**(33), 20015–20026. ISSN 10916490. Dostupné z: doi:10.1073/PNAS.2005570117
- O'FLAHERTY, C., E. DE LAMIRANDE a C. GAGNON, 2004. Phosphorylation of the Arginine-X-X-(Serine/Threonine) motif in human sperm proteins during capacitation: Modulation and protein kinase A dependency. *Molecular Human Reproduction* [online]. **10**(5), 355–363. ISSN 13609947. Dostupné z: doi:10.1093/molehr/gah046
- OLDS-CLARKE, Patricia, Stephen H. PILDER, Pablo E. VISCONTI, Stuart B. MOSS, Joanne M. ORTH a Gregory S. KOPF, 1996. Sperm from mice carrying two t haplotypes do not possess a tyrosine phosphorylated form of hexokinase. *Molecular Reproduction and Development* [online]. **43**(1), 94–104. ISSN 1040452X. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199601)43:1<94::AID-MRD12>3.0.CO;2-4
- OLSEN, Ann Karin, Birgitte LINDEMAN, Richard WIGER, Nur DUALE a Gunnar BRUNBORG, 2005. How do male germ cells handle DNA damage? *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. **207**(2 SUPPL.), 521–531. ISSN 10960333. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2005.01.060
- OLSON, Bradley J.S.C., 2016. Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Pharmacology* [online]. **2016**(June), A.3A.1-A.3A.32. ISSN 19348290. Dostupné z: doi:10.1002/cpph.3
- OZKEMAHLI, Gizem, Aylin BALCI OZYURT, Pinar ERKEKOGLU, Naciye Dilara ZEYBEK, Nilgun YERSAL a Belma KOCER-GUMUSEL, 2022. The effects of prenatal and lactational bisphenol A and/or di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on female reproductive system. *Toxicology Mechanisms and Methods* [online]. **0**(0), 1–9. ISSN 1537-6516. Dostupné z: doi:10.1080/15376516.2022.2057265
- PEKNICOVÁ, Jana, Vendula KYSELOVÁ, Michael BOUBELÍK a Dana BUCKIOVÁ, 2002. Effect of an endocrine disruptor on mammalian fertility. Application of monoclonal antibodies against sperm proteins as markers for testing sperm damage. *American*

- Journal of Reproductive Immunology [online]. 47(5), 311–318. ISSN 87558920. Dostupné z: doi:10.1034/j.1600-0897.2002.01112.x
- POCAR, Paola, Nadia FIANDANESE, Anna BERRINI, Camillo SECCHI a Vitaliano BORROMEO, 2017a. Maternal exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) promotes the transgenerational inheritance of adult-onset reproductive dysfunctions through the female germline in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. **322**, 113–121. ISSN 10960333. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2017.03.008
- POCAR, Paola, Nadia FIANDANESE, Anna BERRINI, Camillo SECCHI a Vitaliano BORROMEO, 2017b. Maternal exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) promotes the transgenerational inheritance of adult-onset reproductive dysfunctions through the female germline in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. **322**, 113–121. ISSN 10960333. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2017.03.008
- POCAR, Paola, Nadia FIANDANESE, Camillo SECCHI, Anna BERRINI, Bernd FISCHER, Juliane Susanne SCHMIDT, Kristina SCHAEDELICH, Stewart M. RHIND, Zulin ZHANG a Vitaliano BORROMEO, 2012. Effects of polychlorinated biphenyls in CD-1 mice: Reproductive toxicity and intergenerational transmission. *Toxicological Sciences* [online]. **126**(1), 213–226. ISSN 10960929. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfr327
- POINTIS, Georges a Dominique SEGRETAIN, 2005. Role of connexin-based gap junction channels in testis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* [online]. **16**(7), 300–306. ISSN 10432760. Dostupné z: doi:10.1016/j.tem.2005.07.001
- PROKEŠOVÁ, Šárka, Kamar GHAIBOUR, František LIŠKA, Pavel KLEIN, Tereza FENCLOVÁ, Miriama ŠTIAVNICKÁ, Petr HOŠEK, Tereza ŽALMANOVÁ, Kristýna HOŠKOVÁ, Hedvika ŘIMNÁČOVÁ, Jaroslav PETR, Milena KRÁLÍČKOVÁ a Jan NEVORAL, 2020. Acute low-dose bisphenol S exposure affects mouse oocyte quality. *Reproductive Toxicology* [online]. **93**(September 2019), 19–27. ISSN 08906238. Dostupné z: doi:10.1016/j.reprotox.2019.12.005
- RAHMAN, Md Saidur, Woo Sung KWON, Polash Chandra KARMAKAR, Sung Jae YOON, Buom Yong RYU a Myung Geol PANG, 2017. Gestational exposure to bisphenol A affects the function and proteome profile of F1 spermatozoa in adult mice. *Environmental Health Perspectives* [online]. **125**(2), 238–245. ISSN 15529924. Dostupné z: doi:10.1289/EHP378
- RAHMAN, Md Saidur, Woo Sung KWON, June Sub LEE, Sung Jae YOON, Buom Yong RYU a Myung Geol PANG, 2015. Bisphenol-A Affects Male Fertility via Fertility-related Proteins in Spermatozoa. *Scientific Reports* [online]. **5**(1), 1–9. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/srep09169
- RAJABI, H., H. MOHSENI-KOUCHESFEHANI, T. ESLAMI-ARSHAGHI a M. SALEHI, 2018. Sperm DNA fragmentation affects epigenetic feature in human male pronucleus. *Andrologia* [online]. **50**(1), 1–7. ISSN 14390272. Dostupné z: doi:10.1111/and.12800
- RICHTER, Christoph, 1992. Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria. *Mutation Research DNAGing* [online]. **275**(3–6), 249–255. ISSN 09218734. Dostupné z: doi:10.1016/0921-8734(92)90029-O
- ŘIMNÁČOVÁ, Hedvika, Miriam ŠTIAVNICKÁ, Jiří MORAVEC, Marouane CHEMEK, Yaroslav KOLINKO, Olga GARCÍA-ÁLVAREZ, Peter R. MOUTON, Azalia Mariel Carranza TREJO, Tereza FENCLOVÁ, Nikola ERETOVÁ, Petr HOŠEK, Pavel KLEIN, Milena KRÁLÍČKOVÁ, Jaroslav PETR a Jan NEVORAL, 2020. Low doses of Bisphenol S affect post-translational modifications of sperm proteins in male mice. *Reproductive Biology and Endocrinology* [online]. **18**(1), 56. ISSN 1477-7827. Dostupné z: doi:10.1186/s12958-020-00596-x

- RITAGLIATI, Carla, Guillermina M. LUQUE, Cintia STIVAL, Carolina BARO GRAF, Mariano G. BUFFONE a Dario KRAPP, 2018. Lysine acetylation modulates mouse sperm capacitation. *Scientific Reports* [online]. **8**(1), 1–14. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-31557-5
- ROCHESTER, Johanna R. a Ashley L. BOLDEN, 2015. Bisphenol S and F: A systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol a substitutes. *Environmental Health Perspectives* [online]. **123**(7), 643–650. ISSN 15529924. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.1408989
- ROSENMAI, Anna Kjerstine, Marianne DYBDAHL, Mikael PEDERSEN, Barbara Medea Alice VAN VUGT-LUSSENBURG, Eva Bay WEDEBYE, Camilla TAXVIG a Anne Marie VINGGAARD, 2014. Are structural analogues to bisphenol a safe alternatives? *Toxicological Sciences* [online]. **139**(1), 35–47. ISSN 10960929. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfu030
- SALIAN, Smita, Tanvi DOSHI a Geeta VANAGE, 2011. Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects fertility of male offspring-An overview. *Reproductive Toxicology* [online]. **31**(3), 359–362. ISSN 08906238. Dostupné z: doi:10.1016/j.reprotox.2010.10.008
- SATHANANTHAN, A. Henry, Kamala SELVARAJ a Alan TROUNSON, 2000. Fine structure of human oogonia in the foetal ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. **161**(1–2), 3–8. ISSN 03037207. Dostupné z: doi:10.1016/S0303-7207(99)00216-6
- SEDÓ, Cristian Alvarez, Melina BILINSKI, Daniela LORENZI, Heydy URIONDO, Felicitas NOBLÍA, Valeria LONGOBUCCO, Estefanía Ventimiglia LAGAR a Florencia NODAR, 2017. Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: Clinical and biological aspects. *Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida* [online]. **21**(4), 343–350. ISSN 15180557. Dostupné z: doi:10.5935/1518-0557.20170061
- SHARMA, Arishya, Kamini SINGH a Alexandru ALMASAN, 2012. Histone H2AX phosphorylation: A marker for DNA damage. *Methods in Molecular Biology* [online]. **920**(May), 613–626. ISSN 10643745. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-998-3_40
- SHI, Mingxin, Nikola SEKULOVSKI, James A. MACLEAN a Kanako HAYASHI, 2017. Effects of bisphenol A analogues on reproductive functions in mice. *Reproductive Toxicology* [online]. **73**, 280–291. ISSN 18731708. Dostupné z: doi:10.1016/j.reprotox.2017.06.134
- SHI, Mingxin, Allison E WHORTON, Nikola SEKULOVSKI, James A MACLEAN a Kanako HAYASHI, 2019. Prenatal Exposure to Bisphenol A, E, and S Induces Transgenerational Effects on Male Reproductive Functions in Mice. *Toxicological Sciences* [online]. **172**(2), 303–315. ISSN 1096-6080. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfz207
- SIMERLY, Calvin, Marion MANIL-SÉGALEN, Carlos CASTRO, Carrie HARTNETT, Dong KONG, Marie Hélène VERLHAC, Jadranka LONCAREK a Gerald SCHATTEN, 2018. Separation and Loss of Centrioles From Primordial Germ Cells To Mature Oocytes In The Mouse. *Scientific Reports* [online]. **8**(1), 1–17. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-31222-x
- SIMONEAU, C., S. VALZACCHI, V. MORKUNAS a L. VAN DEN EEDE, 2011a. Comparison of migration from polyethersulphone and polycarbonate baby bottles. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* [online]. **28**(12), 1763–1768. ISSN 19440049. Dostupné z: doi:10.1080/19440049.2011.604644
- SIMONEAU, C., S. VALZACCHI, V. MORKUNAS a L. VAN DEN EEDE, 2011b. Comparison of migration from polyethersulphone and polycarbonate baby bottles. *Food*

- Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* [online]. **28**(12), 1763–1768. ISSN 19440049. Dostupné z: doi:10.1080/19440049.2011.604644
- SKLEDAR, Darja Gramec, Jan SCHMIDT, Anja FIC, Ivana KLOPČIČ, Jurij TRONTELJ, Marija Sollner DOLENC, Moshe FINEL a Lucija Peterlin MAŠIČ, 2016. Influence of metabolism on endocrine activities of bisphenol S. *Chemosphere* [online]. **157**, 152–159. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2016.05.027
- STEGER, Klaus, Frank TETENS a Martin BERGMANN, 1999. Expression of connexin 43 in human testis. *Histochemistry and Cell Biology* [online]. **112**(3), 215–220. ISSN 09486143. Dostupné z: doi:10.1007/s004180050409
- ŠTIAVNICKÁ, Miriama, Olga GARCÍA-ÁLVAREZ, Zděnka ULČOVÁ-GALLOVÁ, Peter SUTOVSKY, Laura ABRIL-PARREÑO, Martina DOLEJŠOVÁ, Hedvika ŘIMNÁČOVÁ, Jiří MORAVEC, Petr HOŠEK, Petr LOŠAN, Lukáš GOLD, Tereza FENCLOVÁ, Milena KRÁLÍČKOVÁ a Jan NEVORAL, 2019. H3K4me2 accompanies chromatin immaturity in human spermatozoa: an epigenetic marker for sperm quality assessment. *Systems Biology in Reproductive Medicine* [online]. **66**(1), 1–9. ISSN 1939-6368. Dostupné z: doi:10.1080/19396368.2019.1666435
- STRINGER, Jessica M., Amy WINSHIP, Nadeen ZERFA, Matthew WAKEFIELD a Karla HUTT, 2020. Oocytes can efficiently repair DNA double-strand breaks to restore genetic integrity and protect offspring health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **117**(21), 11513–11522. ISSN 10916490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.2001124117
- SUZUKI, Susumu, Yoshinori HINOKIO, Koga KOMATU, Masataka OHTOMO, Masatoshi ONODA, Satoshi HIRAI, Masashi HIRAI, Aki HIRAI, Masaki CHIBA, Shigeru KASUGA, Hiroaki AKAI a Takayoshi TOYOTA, 1999. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*. **45**, 161–168.
- SZKODZIAK, Filip, Jarosław KRZYŻANOWSKI a Piotr SZKODZIAK, 2020. Psychological aspects of infertility. A systematic review. *Journal of International Medical Research* [online]. **48**(6). ISSN 14732300. Dostupné z: doi:10.1177/0300060520932403
- TAMURA, Aileen N., Thomas T.F. HUANG a Yusuke MARIKAWA, 2013. Impact of vitrification on the meiotic spindle and components of the microtubule-organizing center in mouse mature oocytes. *Biology of Reproduction* [online]. **89**(5), 1–10. ISSN 15297268. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod.113.108167
- TIAN, Jijing, Ye DING, Ruiping SHE, Longhuan MA, Fang DU, Kangkang XIA a Lili CHEN, 2017. Histologic study of testis injury after bisphenol A exposure in mice: Direct evidence for impairment of the genital system by endocrine disruptors. *Toxicology and Industrial Health* [online]. **33**(1), 36–45. ISSN 14770393. Dostupné z: doi:10.1177/0748233716658579
- TRAPPHOFF, Tom, Martyna HEILIGENTAG, Nady EL HAJJ, Thomas HAAF a Ursula EICHENLAUB-RITTER, 2013. Chronic exposure to a low concentration of bisphenol A during follicle culture affects the epigenetic status of germinal vesicles and metaphase II oocytes. *Fertility and Sterility* [online]. **100**(6), 1758-1767.e1. ISSN 15565653. Dostupné z: doi:10.1016/j.fertnstert.2013.08.021
- ULLAH, A., M. PIRZADA, S. JAHAN, H. ULLAH, S. RAZAK, N. RAUF, M. J. KHAN a S. Z. MAHBOOB, 2019a. Prenatal BPA and its analogs BPB, BPF, and BPS exposure and reproductive axis function in the male offspring of Sprague Dawley rats. *Human and Experimental Toxicology* [online]. **38**(12), 1344–1365. ISSN 14770903. Dostupné z: doi:10.1177/0960327119862335

- ULLAH, Asad, Madeeha PIRZADA, Sarwat JAHAN, Hizb ULLAH a Muhammad Jamil KHAN, 2019b. Bisphenol A analogues bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S induce oxidative stress, disrupt daily sperm production, and damage DNA in rat spermatozoa: a comparative in vitro and in vivo study. *Toxicology and Industrial Health* [online]. **35**(4), 294–303. ISSN 14770393. Dostupné z: doi:10.1177/0748233719831528
- ULLAH, Asad, Madeeha PIRZADA, Sarwat JAHAN, Hizb ULLAH, Ghazala SHAHEEN, Humaira REHMAN, Mariyam Fatima SIDDIQUI a Maisra Azhar BUTT, 2018. Bisphenol A and its analogs bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S: Comparative in vitro and in vivo studies on the sperms and testicular tissues of rats. *Chemosphere* [online]. **209**, 508–516. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2018.06.089
- VANDENBERG, Laura N., Theo COLBORN, Tyrone B. HAYES, Jerrold J. HEINDEL, David R. JACOBS, Duk Hee LEE, Toshi SHIODA, Ana M. SOTO, Frederick S. VOM SAAL, Wade V. WELSHONS, R. Thomas ZOELLER a John Peterson MYERS, 2012. *Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses* [online]. červen 2012. ISSN 0163769X. Dostupné z: doi:10.1210/er.2011-1050
- VERBANCK, Marie, Mickaël CANOUIL, Audrey LELOIRE, Véronique DHENNIN, Xavier COUMOUL, Loïc YENGO, Philippe FROGUEL a Odile POULAIN-GODEFROY, 2017. Low-dose exposure to bisphenols A, F and S of human primary adipocyte impacts coding and non-coding RNA profiles. *PLoS ONE* [online]. **12**(6), 1–20. ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0179583
- VERLHAC, M.H., H. de PENNART, B. MARO, M. H. COBB a H. J. CLARKE, 1993. MAP Kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology*. **158**, 330–340.
- WALKER, Cheryl Lyn, 2016. Minireview: Epigenomic plasticity and vulnerability to EDC exposures. *Molecular Endocrinology* [online]. **30**(8), 848–855. ISSN 19449917. Dostupné z: doi:10.1210/me.2016-1086
- WANG, Siyao, David H. MEYER a Björn SCHUMACHER, 2020. H3K4me2 regulates the recovery of protein biosynthesis and homeostasis following DNA damage. *Nature Structural and Molecular Biology* [online]. **27**(12), 1165–1177. ISSN 15459985. Dostupné z: doi:10.1038/s41594-020-00513-1
- WANG, Teng, Jun HAN, Xing DUAN, Bo XIONG, Xiang Shun CUI, Nam Hyung KIM, Hong Lin LIU a Shao Chen SUN, 2016. The toxic effects and possible mechanisms of bisphenol A on oocyte maturation of porcine in vitro. *Oncotarget* [online]. **7**(22), 32554–32565. ISSN 19492553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.8689
- WANG, Wei, Khalid O. ABUALNAJA, Alexandros G. ASIMAKOPOULOS, Adrian COVACI, Bondi GEVAO, Boris JOHNSON-RESTREPO, Taha A. KUMOSANI, Govindan MALARVANNAN, Tu Binh MINH, Hyo Bang MOON, Haruhiko NAKATA, Ravindra K. SINHA a Kurunthachalam KANNAN, 2015. A comparative assessment of human exposure to tetrabromobisphenol A and eight bisphenols including bisphenol A via indoor dust ingestion in twelve countries. *Environment International* [online]. **83**, 183–191. ISSN 18736750. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2015.06.015
- WEN, Qing, Elizabeth I. TANG, Ying GAO, Tito T. JESUS, Darren S. CHU, Will M. LEE, Chris K.C. WONG, Yi Xun LIU, Xiang XIAO, Bruno SILVESTRINI a C. Yan CHENG, 2018. Signaling pathways regulating blood–tissue barriers — Lesson from the testis. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* [online]. **1860**(1), 141–153. ISSN 18792642. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamem.2017.04.020

- WONG, Katelyn H. a Timur S. DURRANI, 2017a. Exposures to Endocrine Disrupting Chemicals in Consumer Products—A Guide for Pediatricians. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care* [online]. **47(5)**, 107–118. ISSN 15383199. Dostupné z: doi:10.1016/j.cppeds.2017.04.002
- WONG, Katelyn H. a Timur S. DURRANI, 2017b. Exposures to Endocrine Disrupting Chemicals in Consumer Products—A Guide for Pediatricians. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care* [online]. **47(5)**, 107–118. ISSN 15383199. Dostupné z: doi:10.1016/j.cppeds.2017.04.002
- WU, Liu Hong, Xue Mei ZHANG, Fei WANG, Chong Jing GAO, Da CHEN, Jillian R. PALUMBO, Ying GUO a Eddy Y. ZENG, 2018. *Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: A short review* [online]. 15. únor 2018. B.m.: Elsevier B.V. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.194
- WYCK, Sarah, Carolina HERRERA, Cristina E. REQUENA, Lilli BITTNER, Petra HAJKOVA, Heinrich BOLLWEIN a Raffaella SANTORO, 2018. Oxidative stress in sperm affects the epigenetic reprogramming in early embryonic development 06 Biological Sciences 0604 Genetics 11 Medical and Health Sciences 1114 Paediatrics and Reproductive Medicine 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell . *Epigenetics and Chromatin* [online]. **11(1)**, 1–17. ISSN 17568935. Dostupné z: doi:10.1186/s13072-018-0224-y
- YAN CHENG, C. a Dolores D. MRUK, 2012. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews* [online]. **64(1)**, 16–64. ISSN 00316997. Dostupné z: doi:10.1124/pr.110.002790
- YAWER, Affiefa, Eliška SYCHROVÁ, Petra LABOHÁ, Jan RAŠKA, Tomáš JAMBOR, Pavel BABICA a Iva SOVADINOVÁ, 2020. Endocrine-disrupting chemicals rapidly affect intercellular signaling in Leydig cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 404(July). ISSN 10960333. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2020.115177
- YAWER, Affiefa, Eliška SYCHROVÁ, Jan RAŠKA, Pavel BABICA a Iva SOVADINOVÁ, 2022. Endocrine-disrupting chemicals affect Sertoli TM4 cell functionality through dysregulation of gap junctional intercellular communication in vitro. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 164(January). ISSN 18736351. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2022.113004
- ZHANG, Ming Yu, Yu TIAN, Zi Hui YAN, Wei Dong LI, Chuan Jie ZANG, Lan LI, Xiao Feng SUN, Wei SHEN a Shun Feng CHENG, 2020. Maternal Bisphenol S exposure affects the reproductive capacity of F1 and F2 offspring in mice. *Environmental Pollution* [online]. **267**, 115382. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2020.115382
- ZHANG, Wenjuan, Tao HUANG, Zhangbei SUN, Haibin KUANG, Yangyang YUAN, Weiyang ZOU, Fangming LIU, Fan ZHANG, Bei YANG, Lei WU a Dalei ZHANG, 2022. Bisphenol S exposure induces cytotoxicity in mouse Leydig cells. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **160**(December 2021), 112805. ISSN 18736351. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2021.112805
- ZHOU, Yu a Yunyan WANG, 2022. Action and Interaction between Retinoic Acid Signaling and Blood-Testis Barrier Function in the Spermatogenesis Cycle. *Cells* [online]. **11(3)**, 1–10. ISSN 20734409. Dostupné z: doi:10.3390/cells11030352

Přehled publikační činnosti autora

ŘIMNÁČOVÁ, Hedvika, Jiří MORAVEC, Miriama ŠTIAVNICKÁ, Jiřina HAVRÁNKOVÁ, Ladan MONSEF, Petr HOŠEK, Šárka PROKEŠOVÁ, Tereza ŽALMANOVÁ, **Tereza FENCLOVÁ**, Jaroslav PETR, Milena KRÁLÍČKOVÁ a Jan NEVORAL. Evidence of endogenously produced hydrogen sulfide (H₂S) and persulfidation in male reproduction. *Scientific Reports*. 2022 [cit. 2022-07-14]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi: 10.1038/s41598-022-15360-x (**IF=5,134**)

FENCLOVÁ, Tereza, Hedvika ŘIMNÁČOVÁ, Marouane CHEMEK, Jiřina HAVRÁNKOVÁ, Pavel KLEIN, Milena KRÁLÍČKOVÁ a Jan NEVORAL. Nursing Exposure to Bisphenols as a Cause of Male Idiopathic Infertility. *Frontiers in Physiology* [online]. 2022, 13 [cit. 2022-06-30]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2022.725442 (**IF= 4,566**)

NEVORAL, Jan, Jiřina HAVRÁNKOVÁ, Yaroslav KOLINKO, Šárka PROKEŠOVÁ, **Tereza FENCLOVÁ**, Ladan MONSEF, Tereza ŽALMANOVÁ, Jaroslav PETR a Milena KRÁLÍČKOVÁ. Exposure to alternative bisphenols BPS and BPF through breast milk: Noxious heritage effect during nursing associated with idiopathic infertility. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2021, 413 [cit. 2022-06-30]. ISSN 0041008X. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2021.115409 (**IF= 4,219**)

ŘIMNÁČOVÁ, Hedvika, Miriam ŠTIAVNICKÁ, Jiří MORAVEC, Yaroslav KOLINKO, Olga GARCÍA-ALVAREZ, Peter R. MOUTON, Azalia Mariel CARRANZA TREJO, **Tereza FENCLOVÁ**, Nikol ERETOVÁ, Petr HOŠEK, Pavel KLEIN, Milena KRÁLÍČKOVÁ a Jan NEVORAL. Low doses of Bisphenol S affect post-translational modifications of sperm proteins in male mice. *Reproductive Biology and Endocrinology* [online]. 2020, 18(1) [cit. 2022-06-30]. ISSN 1477-7827. Dostupné z: doi:10.1186/s12958-020-00596-x (**IF= 5,017**)

PROKEŠOVÁ, Šárka, Kamar GHAIBOUR, František LIŠKA, Pavel KLEIN, **Tereza FENCLOVÁ**, Miriama ŠTIAVNICKÁ, Petr HOŠEK, Tereza ŽALMANOVÁ, Kristýna HOŠKOVÁ, Hedvika ŘIMNÁČOVÁ, Jaroslav PETR, Milena KRÁLÍČKOVÁ a Jan NEVORAL. Acute low-dose bisphenol S exposure affects mouse oocyte quality. *Reproductive Toxicology* [online]. 2020, 93, 19-27 [cit. 2022-06-30]. ISSN 08906238. Dostupné z: doi:10.1016/j.reprotox.2019.12.005 (**IF= 3,143**)

NEVORAL, Jan, Lukáš LANDSMANN, Miriam ŠTIAVNICKÁ, Petr HOŠEK, Jiří MORAVEC, Šárka PROKEŠOVÁ, Hedvika ŘIMNÁČOVÁ, Eliška KOUTNÁ, Pavel KLEIN, Kristýna HOŠKOVÁ, Tereza ŽALMANOVÁ, **Tereza FENCLOVÁ**, Jaroslav PETR a Milena KRÁLÍČKOVÁ. Epigenetic and non-epigenetic mode of SIRT1 action during oocyte meiosis progression. *Journal of Animal Science and Biotechnology* [online]. 2019, 10(1) [cit. 2022-06-30]. ISSN 2049-1891. Dostupné z: doi:10.1186/s40104-019-0372-3 (**IF= 5,922**)

ŠTIAVNICKÁ, Miriama, Olga GARCÍA-ÁLVAREZ, Zdenka ULČOVÁ-GALLOVÁ, Peter SUTOVSKY, Laura ABRIL-PARENO, Martina DOLEJŠOVÁ, Hedvika ŘIMNÁČOVÁ, Jiří MORAVEC, Petr HOŠEK, Petr LOŠAN, Lukáš GOLD, **Tereza FENCLOVÁ**, Milena KRÁLÍČKOVÁ a Jan NEVORAL. H3K4me2 accompanies chromatin immaturity in human spermatozoa: an epigenetic marker for sperm quality

assessment. *Systems Biology in Reproductive Medicine* [online]. 2020, 66(1), 3-11 [cit. 2022-06-30]. ISSN 1939-6368. Dostupné z: doi:10.1080/19396368.2019.1666435 (**IF= 2,884**)

JOVIČIČ, Marija, Eliana PINTUS, **Tereza FENCLOVÁ**, Ondřej ŠIMONÍK, Eva CHMELÍKOVÁ, José Luis ROS-SANTAELLA a Markéta SEDMÍKOVÁ. Effect of nitric oxide on boar sperm motility, membrane integrity, and acrosomal status during semen storage. *Polish Journal of Veterinary Sciences* [online]. 2018, 21(1), 73-82 [cit. 2022-06-30]. ISSN 1505-1773. Dostupné z: doi: 10.24425/119024 (**IF=0,859**)

Under review:

FENCLOVÁ, Tereza, Marouane CHEMEK, Jiřina HAVRÁNKOVÁ, Yaroslav KOLINKO, Vendula SUDOVA, Jiří MORAVEC, Jana NAVRÁTILOVÁ, Pavel KLEIN, Milena KRÁLÍČKOVÁ a Jan NEVORAL. Effect of bisphenol S on testicular tissue after low-dose nursing exposure. *Environmental Pollution*. 2022 [cit. 2022-06-30]. Under review. (**IF= 8,071**)

Aktivní účast na konferencích:

26th Symposium of Biology and Immunology of Reproduction (SBIR2021), 2021 (Liblice, Česká republika)

Poster: Nursing exposure to bisphenol S (BPS) as a cause of male idiopathic infertility.

28. symposium Asistované reprodukce a 17. Česko-Slovenská konference reprodukční gynekologie, 2018 (Brno, Česká republika)

Poster: Bisfenol S (BPS) postihuje histonový kód během časného embryonálního vývoje