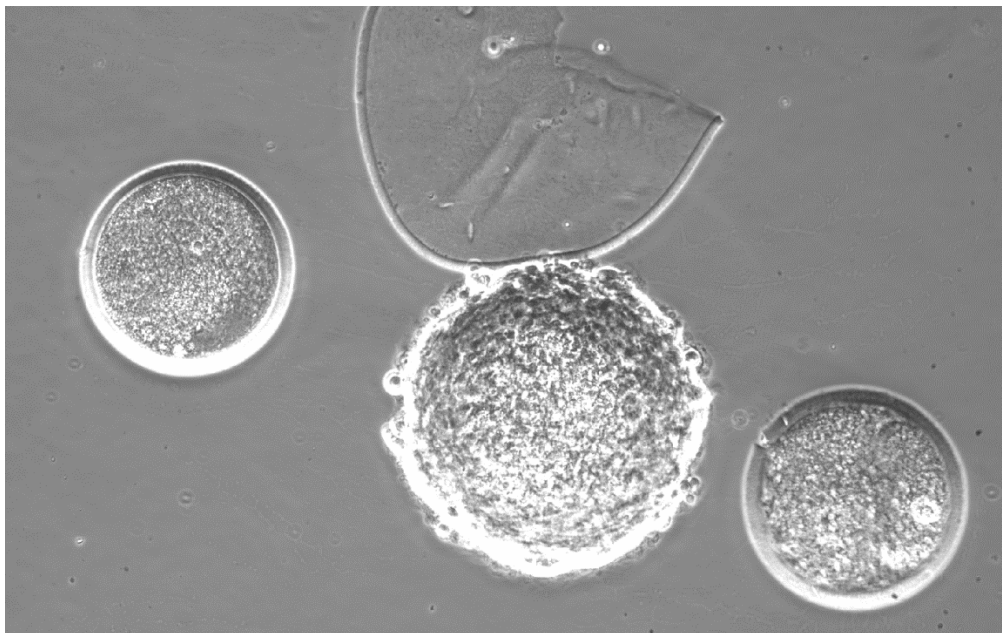


# Effekten av PCB126 *in vitro* på tidig embryonalutveckling hos nötkreatur

## The Effect of PCB126 on Bovine Early Embryo Development *in vitro*



*Oskar Eriksson*

*Uppsala*

*2020*



# Effekten av PCB126 *in vitro* på tidig embryonalutveckling hos nötkreatur

## The Effect of PCB126 on Bovine Early Embryo Development *in vitro*

Oskar Eriksson

**Handledare:** Denise Laskowski, Institutionen för kliniska vetenskaper

**Biträdande handledare:** Ylva Sjunnesson, Institutionen för kliniska vetenskaper

**Biträdande handledare:** Malin Helmestam, Institutionen för kliniska vetenskaper

**Examinator:** Ann-Sofi Bergqvist, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A2E

**Kurskod:** EX0869

**Kursansvarig institution:** Institutionen för kliniska vetenskaper

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2020

**Elektronisk publicering:** <https://stud.epsilon.slu.se>

**Omslagsillustration:** Foto taget av Oskar Eriksson

**Nyckelord:** Nötkreatur, bovin, embryoutveckling, *in vitro*, IVF, IVP, IVM, PCB, PCB 126, polyklorerade bifenyl

**Key words:** Bovine, embryo development, *in vitro*, IVF, IVP, IVM, PCB, PCB 126, polychlorinated biphenyls

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper



## SAMMANFATTNING

Polyklorerade bifenyler (PCB) är industrikemikalier som började framställas i stora mängder under 1930-talet. Kommersiellt har PCB varit tillgängligt som komplexa kemiska blandningar i bland annat bekämpningsmedel, färg, plaster och olika elektriska komponenter. PCB är en grupp av över 200 dioxin- eller icke dioxinlika klorerade kolväten. Den kemiska strukturen gör PCB hydrofoba och extremt motståndskraftiga mot nedbrytning, vilka därför klassas som persistenta organiska föroreningar. På miljö- och hälsomässiga grunder började så småningom restriktioner införas i användningen på 1970- och 80-talet, följt av ett totalförbud för tillverkning och användning av PCB i många länder. Trots detta är PCB fortfarande högaktuella miljögifter som i olika halter påträffas i mark och vattendrag, samt i nästan alla levande arter över hela jorden. Exponering för PCB exempelvis genom födan har visat sig vara toxiskt i många avseenden, men det är svårt att utröna vid vilka koncentrationer, exponeringstider eller de exakta mekanismerna bakom observationerna. Bland de negativa hälsoeffekter som PCB orsakar eller misstänks förorsaka nämns bland andra hormonella störningar, reproduktions- och utvecklingsrubbingar samt cancer.

Syftet bakom studien var att undersöka hur PCB126 påverkar den tidiga embryoutvecklingen in vitro genom att tillsätta PCB126 i mognadsmedium innehållande oocyter från nötkreatur. Oocyterna togs ur äggstockar införskaffade från ett slakteri. Genom insamling och analysering av data över mognad, celldelning och embryoutveckling kunde eventuella effekter av exponeringen utvärderas. Baserat på vedertagna morfologiska kriterier delades oocyterna slumpmässigt upp i tre behandlingsgrupper: en med PCB126 löst i dimetylsulfoxid (DMSO) (P), en med endast DMSO (D) och en kontrollgrupp (C) utan tillsatser i mognadsmediet. Koncentrationerna som användes i de första två omgångarna var 10 µg/ml PCB126 och DMSO 1:1, följt av 5 µg/ml PCB126 och DMSO 1:1 i de efterföljande fyra omgångarna. Exponeringen varade i 22 timmar under oocyternas mognadsfas. Efter exponeringen under mognadsperioden genomfördes fertilisering och embryodling enligt rutinprotokoll. Studien bestod av sex separata omgångar innehållande totalt 729 stycken oocyter och genomfördes under oktober månad 2019. Utvärderingen bestod av fixering och kärnfärgning av totalt 408 stycken embryon och oocyter. Sambandet mellan behandling och utfall beräknades med logistisk regression (95 % konfidensintervall) och p-värden <0,05 ansågs vara signifikant.

Trots att ingen signifikant skillnad kunde påvisas gällande andel utvecklade blastocyster, blastocyststadie eller -kvalitet grupperna emellan, visade sig antalet cellkärnor och cykler i grupp P vara signifikant lägre än i grupp D ( $p < 0,05$ ) efter kärnfärgning. Ingen signifikant skillnad mellan grupp C och D kunde påvisas. Även antalet embryon som delat sig mer än en gång var signifikant lägre i grupp P ( $p < 0,005$ ), men även i grupp C ( $p < 0,00005$ ) jämfört med grupp D (oddskvot (OR) = 0,58 respektive 0,43). Celldelningen 44 timmar efter fertilisering var i grupp C signifikant lägre ( $p < 0,001$ ) jämfört med grupp D (OR = 0,5). Ingen signifikant skillnad sågs mellan grupp P och D. Sammantaget verkar det finnas tecken på att PCB126 kan ha negativa effekter på tidig embryonal utveckling in vitro, vilket överensstämmer med rådande vetenskaplig konsensus. Toxiciteten verkar delvis härröra från olika endokrinstörande processer, men fler studier behövs på olika PCB och PCB-blandningar för att tydliggöra de specifika mekanismerna bakom observationerna.

## SUMMARY

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are industrial chemicals which first started to be produced in large quantities during the 1930s. Commercially, PCBs have been available as complex chemical mixtures in pesticides, paints, plastics and various electrical components. PCBs are a group of over 200 dioxin or non-dioxin like chlorinated hydrocarbons. The chemical structure makes PCBs hydrophobic and extremely resistant to degradation and therefore, they are classified as persistent organic pollutants. On environmental and health grounds, restrictions in its use began to be introduced in the 1970s and 1980s, followed by a total ban on the manufacturing and usage of PCBs in many countries. Alas, PCBs are still vastly present environmental toxins found at various levels in soil and waterways, as well as in almost all living species on earth. Exposure to PCBs, for instance through food, has proven to be toxic in many respects, but it is difficult to ascertain at what concentrations, exposure times or the exact mechanisms behind these observations. Among the adverse health effects that PCBs cause or are suspected to cause are endocrine, reproductive and developmental disorders and cancer.

The purpose of this study was to investigate how PCB126 affects bovine early embryonic development *in vitro* by adding PCB126 during oocyte maturation. The egg cells were collected from ovaries obtained from an abattoir. By collecting and analyzing data on maturation, cell division and embryo development, effects of the exposure could be evaluated. Based on recognized morphological criteria, the egg cells were randomly divided into three treatment groups: one with PCB126 and dimethyl sulfoxide (DMSO) (P), one with DMSO (D) and a control group (C) with standard maturation medium. The concentrations used for the first two rounds were 10 µg/ml PCB126 and DMSO 1:1, followed by 5 µg/ml PCB126 and DMSO 1:1 for the subsequent four rounds. Exposure lasted for 22 hours during the oocyte's maturation phase *in vitro*. After exposure, fertilization, embryo culture and evaluation were performed according to standardized protocols. This study consisted of six separate batches containing a total of 729 bovine oocytes and was conducted during October 2019. Of these, a total of 408 embryos derived. These were fixated and stained with a nuclear dye. The relationship between treatment and outcome was calculated by logistic regression (95 % confidence interval) and p-values <0,05 were considered significant.

Although no significant difference could be detected in the proportion of developed blastocysts, blastocyst stage or quality between the groups, the number of cell nuclei and cycles in group P was found to be significantly lower than in group D ( $p < 0,05$ ) after nucleus staining. No significant difference between groups C and D could be detected. The number of embryos divided more than once was also significantly lower in group P ( $p < 0,005$ ), but also in group C ( $p < 0,00005$ ) compared to group D (Odds ratio (OR) = 0,58 and 0,43, respectively). Cell division 44 hours after fertilization in Group C was significantly lower ( $p < 0,001$ ) compared to group D (OR = 0.5). No significant difference was seen between groups P and D. In summary, there appears to be evidence that PCB126 could cause adverse effects on early embryonic development *in vitro*, which is consistent with the current scientific consensus. The toxicity seems to be partly due to different endocrine disrupting processes, but more studies are needed on different PCBs and PCB mixtures to clarify the specific mechanisms behind these observations.

# INNEHÅLL

INTRODUKTION .....	1
LITTERATURSTUDIE .....	2
Bovin oocyt- och embryoutveckling .....	2
Oocytens tidiga utveckling i äggstocken .....	2
Follikulogenesen .....	2
Oocytens slutliga utveckling i äggstocken .....	3
Befruktning och den tidiga embryonala utvecklingen .....	4
Att efterlikna <i>in vivo</i> -förhållanden under <i>in vitro</i> -studier .....	5
Polyklorerade bifenyler, PCB .....	5
Förekomst i människokroppen .....	6
PCB och reproduktion .....	7
Oocyter från nötkreatur som studiemodell .....	7
MATERIAL & METODER .....	9
Studiedesign – översikt .....	9
Utförande .....	9
Kommersiella produkter .....	9
Oocytinsamling .....	9
Randomisering & behandling .....	10
Sökmedium .....	10
<i>In vitro</i> mognad (IVM) .....	10
<i>In vitro</i> fertilisering (IVF) .....	11
<i>In vitro</i> embryoodling (IVC) .....	11
Utvärdering av utvecklingsstadier .....	11
Fixering & färgning .....	12
Analysering .....	12
Statistik .....	13
RESULTAT .....	14
<i>In vitro</i> embryoproduktion .....	14
Celldelning .....	14
Utveckling av blastocyster .....	14
Cellkärnor, stadium och gradering .....	16
DISKUSSION .....	18
Studiedesign .....	18
Behandlingseffekter vid IVP .....	19
Celldelning .....	19
Blastocystutveckling, stadie och grad .....	19
Möjliga involverade mekanismer .....	20
Konklusion .....	20
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING .....	22
Inledning .....	22
Syfte och metod .....	22
Resultat .....	23
Slutsatser .....	23
REFERENSER .....	24





## INTRODUKTION

Polyklorerade bifenyler (PCB) är en grupp organiska kemikalier som sedan 1930-talet tillverkats i stora mängder och använts inom industrin i en mängd olika applikationer. På grund av miljö-, och hälsomässiga skäl förbjöds tillverkning och användning av PCB i många länder under 1980-talet. Dessvärre förekommer PCB fortfarande i miljön till följd av sin kemiska stabilitet och affinitet för hydrofobiska organiska kroppar, som lipider, och klassas därför som persistenta organiska föroreningar (Siracusa *et al.*, 2017; Pedersen *et al.*, 2016; Vorkamp, 2016). Grundstrukturen för PCB består av en till tio kloratomer bundna till en bifenyl, och namngivningen sker utifrån kloreringsgrad och positioner, eller med ett systematiskt nummer (#1 till #209). De flesta är lukt- och färglösa kristaller (Robertson, 2001). PCB delas in i två kategorier, dioxinlika eller icke-dioxinlika, beroende på dess molekylstruktur. PCB126 är det mest toxiska dioxinlika PCB-preparatet (Lindell, 2012; Bhavsar *et al.*, 2008).

Även om bakomliggande mekanismer inte är fullt utredda kan exponering för PCB ge upphov till, eller misstänks förorsaka, en mängd olika sjukdomstillstånd hos både djur och människor (Zhang *et al.*, 2012; Schechter *et al.*, 2006; Pocar *et al.*, 1999; Krogenæs *et al.*, 1998). Reproduktionsstörningar som färre antal graviditeter och ökade antal missfall är några nämnda exempel (Golub *et al.*, 1991; Arnold *et al.*, 1990; Barsotti *et al.*, 1976). År 2015 uppklassade dessutom International Agency for Research on Cancer (IARC) PCB som cancerogen för människor (Zani *et al.*, 2017). De cancerogena effekterna är dock fortfarande omtvistade (Naturvårdsverket, 2017; Zani *et al.*, 2017; Renner, 1999).

Utvecklingstoxikologiska studier har traditionellt sett ofta utövats på gnagare *in vivo*, vilket har visat sig vara en sämre modell än oocyter från nötkreatur där likheterna rörande äggcellsmognad och tidig embryonalutveckling är mer lik människans (Santos *et al.*, 2014). Få studier har gjorts på nötembryon *in vitro* för att undersöka toxiciteten av olika PCB, men i en jämförbar studie (Krogenæs *et al.*, 1998) fastslogs att andelen utvecklade blastocyster var lägre i samtliga koncentrationer innehållande PCB126.

Med detta projekt avsågs att *in vitro* undersöka hur PCB påverkar den tidiga embryoutvecklingen hos nötkreatur genom att tillsätta PCB126 under äggcellsmognadsperioden. Hypotesen var att PCB126 skulle påverka äggcellsmognad och embryoutveckling negativt jämfört med en positiv och en negativ kontrollgrupp. Deskriptiva data över mognad, celldelning och embryoutveckling samlades in, och information om i vilket utvecklingsstadium utvecklingen avstannat efter exponeringen utvärderades.

## LITTERATURSTUDIE

### **Bovin oocyt- och embryoutveckling**

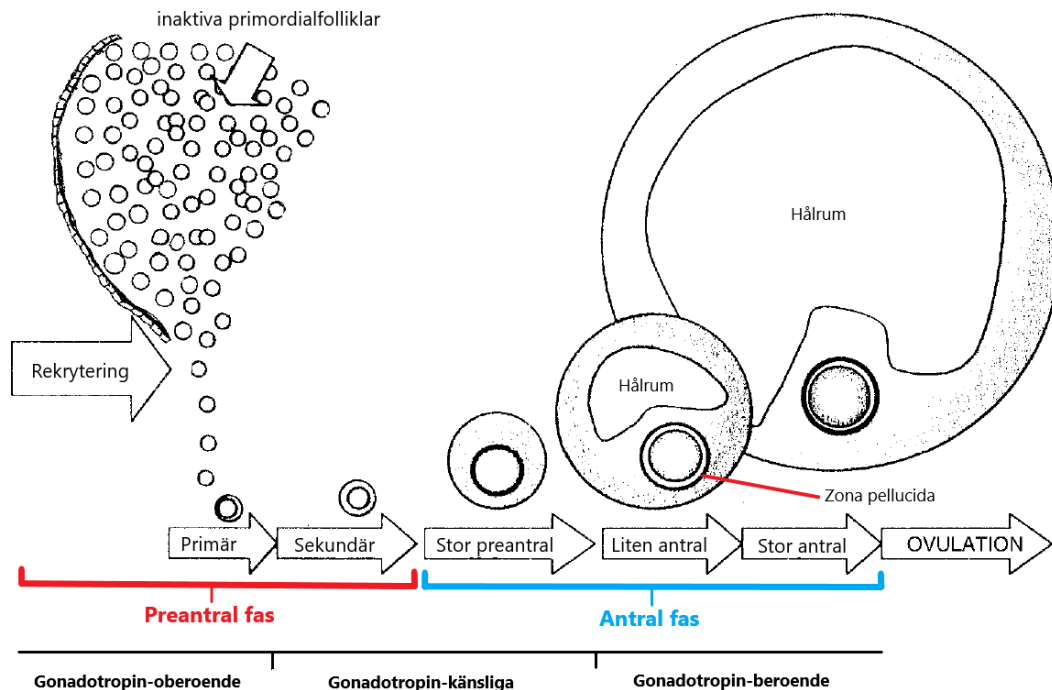
Utvecklingen av den honliga könscellen, oocyten (äggcellen), sker genom en lång rad händelser från differentieringen av oogonia (diploida stamceller) redan i de fetala äggstockarna, till den mogna oocyten precis innan ovulation.

#### ***Oocytens tidiga utveckling i äggstocken***

Follikeln (äggblåsan) är den funktionella enheten i äggstocken hos nötkreatur och där sker mognaden av oocyten under inflytande av könshormoner som steroida östrogener och testosteron, samt peptidhormon som inhibin. Trots att det kan finnas hundratusentals primordialfolliklar (tidiga äggblåsor) innehållande omogna oocyter i äggstockarna hos en kvigkalv, kommer inte mer än runt tre hundra ovulationsdugliga oocyter mogna under en livstid. Äggstockarna har differentierats när embryot i livmodern endast är 41 dagar gammalt. Vid 45 dagar börjar primordialkönsceller, den s.k. äggreserven, att differentieras till oogonia i äggstockens bark och cellerna tappar då sin rörelseförmåga, många organeller och blir rundare till formen. Dessa könsceller börjar i sin tur efter 35 dagar att uppföras genom mitos (celldelning) (Gordon, 2003). Mitoscyklerna pågår under flera månader innan födseln och resulterar i så många som två miljoner könsceller per individ, varav endast kring 5 % kvarstår vid födseln (Picton, 2001). Efter mitoscyklerna inleds meiosfasen som i slutändan leder till den färdigutvecklade äggcell som är redo att ovulera. Under meiosfasen differentierar oogonier till primära oocyter genom att dela sig i två och på så sätt reducera sin diploida kromosomuppsättning ( $2n$ ) till haploid ( $n$ ) (Gordon, 2003).

#### ***Follikulogenesen***

Initieringen av meios sammanfaller med follikulogenesen. Follikulogenes (se figur 1) är processen där follikeln mognar under separata tillväxtfaser. Det finns tre stadier i follikelutvecklingen: ickeväxande (primordialfolliklar), växande (preantralfolliklar), och antralfolliklar vilka skiljer sig åt i storlek och i sin respons på hormon. Samtliga är urskiljbara redan i den fetala äggstocken (Gordon, 2003).



Figur 1. *Follikulogenesens tillväxtfaser* (Gordon, 2003 fig. 2.11. Modifierad av Oskar Eriksson).

Primordialfollikeln består av en ocyt omsluten av några få platta granulosaceller som uppförkas och blir kubformade under mognaden, och övergår till en primärfollikel med en basallamina utvändigt. När granulosacellerna mångdubblats och omsluter oocyten i flera lager benämns den preantral, eller sekundärfollikel, som ytterst utlinjeras av thecaceller. Båda celltyperna är delaktiga i att producera östrogen, men granulosacellerna försörjer även oocyten med näring och bildar ett skyddande icke-cellulärt hölje – zona pellucida.

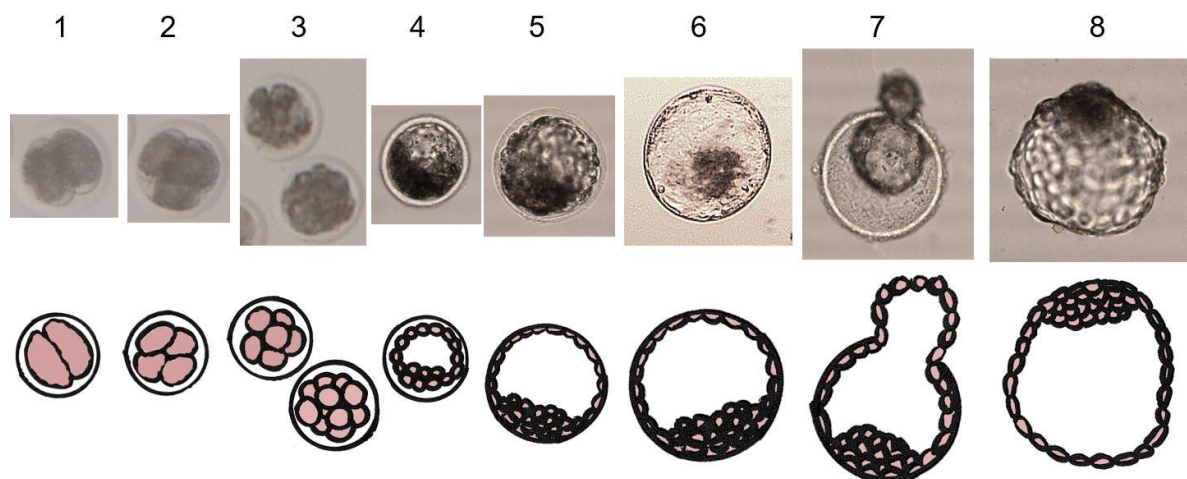
### **Oocyten slutliga utveckling i äggstocken**

Slutligen bildas ett hålrums (antrum) av vätska inuti follikeln vilket kännetecknar utvecklingen av en antralfollikel (Krisher, 2013). Follikulogenesen hos nötkreatur tar uppskattningsvis mellan 80–100 dagar (Britt, 1992). Det hormonella samspelet under den prenatala utvecklingen är inte fullständigt beskrivet, men koncentrationen av follikelstimulerande hormon (FSH), luteiniserande hormon (LH) och östrogen, samt uttrycket av dess receptorer spelar stor roll för follikelutvecklingen (Gordon, 2003). Den slutliga mognaden av follikeln sker under östruscykeln. Adenohypofysen utsöndrar gonadotropinerna FSH, vilket gör att follikelceller prolifererar och differentierar, och LH som initierar framåtskridandet av oocyten meos och ovulering (Krisher, 2013). Under inverkan av cykliskt stigande nivåer av FSH utvecklas gonadotropinresponsiva folliklar till gonadotropinberoende folliklar. Dessa folliklar har ett högre tröskelvärde för FSH gentemot sina föregångare, och från dem kommer en eller flera potentiella ovulatoriska folliklar mogna vilka i sin tur producerar tillräckligt med östradiol och inhibin för att slutligen hämma FSH. När effekten av FSH hämmas kommer de återstående gonadotropinberoende folliklarna att gå i atresi (tillbakabildas), samtidigt som en ny grupp förhindras att utvecklas från de gonadotropinresponsiva folliklarna. Vid denna tidpunkt kan ett av följande två scenarion inträffa: Vid förekomsten av en aktiv gulkropp produceras progesteron som bland annat hämmar FSH vilket förhindrar den följande ägglossningen, och

en s.k. icke-ovulatorisk våg uppstår. Om gulkroppen vid tillfället har tillbakabildats följer istället en ovulatorisk våg, vilket betyder att dominanta folliklar ovulerar under FSH-vågen när estradiol och LH når maximala värden (Scaramuzzi *et al.*, 2011). Den dominanta follikelns oocyt är omgiven av ett moln av differentierade granulosa-celler, s.k. cumulusceller, vilka tillsammans bildar ett cumuluscell- oocyt-komplex (COC) (Gordon, 2003).

### **Befruktning och den tidiga embryonala utvecklingen**

När en spermie penetrerat zona pellucida och överfört sina kromosomer till den haploida oocyten bildas en fullständig diploid cell, en zygot, med potential att genom vidare celldelning och differentiering utvecklas till ett embryo (Reece, 2015). En essentiell händelse som inträffar kring 8-cellsstadiet hos nöt är embryonal genaktivering. Embryot innehåller från befruktningen moderliga mRNA- och makromolekyler i tillräcklig utsträckning för att driva transkription (RNA-syntes) och translation (proteinsyntes) under de första få celldelningarna, men allt eftersom dessa naturligt degenererar är den fortsatta utvecklingen helt beroende av nyproducerade ersättare. Denna övergång från moderlig till embryonal kontroll över transkription och translation kallas på engelska *maternal to embryonic transition* (MET) (Madan, 2011). Under MET sker två morfogenetiska förändringar i embryot innan det vidhäftar till livmoderväggen - kompaktering, följt av kavitation. Vid kompaktering bildas i slutet av 8-cellsstadiet en kompakt cellulär massa, en morula, som till slut består av 16–32 odifferentierade celler (se figur 2, nr 3). Kavitationen äger rum tiden efter (figur 2, nr 4), och kulminerar i formationen av en blastocyst (figur 2, nr 6) efter 6–8 dagar (Reece, 2015; Madan, 2011).



Figur 2. Mikroskoperingsbilder tillsammans med schematiska bilder över den tidiga embryonalutvecklingen. 1: 2-cellsstadie, 2: 4-cellsstadie, 3: 8-cellsstadie (överst) samt morula (nederst), 4: blastocyst, 5: expanderande blastocyst, 6: expanderad blastocyst, 7: blastocyst under kläckning, 8: kläckt blastocyst (Sjunnesson, Y., med tillstånd).

Blastocysten består av en inre cellmassa (ICM), vars celler utgör själva fostret, och ett yttre lager av trofoblastceller som blir den fetala delen av placenta (Madan, 2011). Allt eftersom blastocysten växer tunnns zona pellucida ut för att slutligen spricka (figur 2, nr 7), vilket resulterar i en kläckt blastocyst (figur 2, nr 8) (Sjaastad *et al.*, 2016). Kläckningen ur zona pellucida leder till att blastocysten expanderar påtagligt i storlek och möjliggör för blastocystens

vidhäftning till livmoderväggen (Gordon, 2003). Genom att producera och utsöndra interferon tau förhindrar blastocysten att gulkroppen tillbakabildas genom att lokalt hämma utsöndringen av prostaglandin F2 $\alpha$  från livmoderslemhinnan. Interferon tau tros även framkalla främjande miljöförändringar i livmodern tillsammans med progesteron från gulkroppen. Sammantaget resulterar blastocystens vidhäftning tillsammans med de olika endokrina samspelet i så kallad *maternal recognition of pregnancy*, d.v.s. fysiologiska signaler på dräktighet utan vilket vidareutvecklingen av embryot vore omöjligt (Roberts, 2007). Tiden från befruktning tills att vidhäftning sker tar hos nötkreatur ca 30 dagar (Madan, 2011).

### **Att efterlikna in vivo-förhållanden under in vitro-studier**

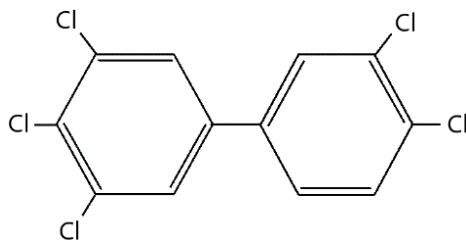
Under försök med embryoodling *in vitro* är målet att uppnå rätt förutsättningar genom att försöka imitera fysiologiska förhållanden på ett optimalt sätt. Embryoproduktion *in vitro* (IVP) består av en trestegsprocess innehållande oocytmognad (IVM), oocytbefruktning (IVF) samt embryoodling (IVC). De flesta studierna avslutas i morula-, blastocyst- eller kläckt blastocyststadium vilket inträffar ungefär 7 till 8 dagar efter befruktning. Orsaken är att det är i detta stadium överföring till ett värdjur eller frysbevaring sker, och att det *in vitro* inte är vanligt med system som kan möjliggöra fortsatt normal utveckling efter kläckning. Anledningen är att utvecklingen fram till blastocyststadiet delvis är autonom (behöver t.ex. ingen kontakt med livmodern), medan senare utveckling uteslutande styrs av maternella faktorer (Krisher, 2013). Det finns i dagsläget fortfarande flera utmaningar associerade med IVP. Varierande oocytkvalitet, suboptimal mediumsammansättning samt högre exponering för oxidativ stress och reaktiva syreföreningar vilka kan skada eller förhindra vidareutveckling av cellerna är svårigheter som måste beaktas (Krisher, 2013; Madan, 2011). Effektivitetsmässigt mognar i ett optimalt system ungefär 90 % av omogna oocyter från folliklar *in vitro*, ca 80 % av dessa befruktas och genomgår minst en celledning, men endast 30–40 % av dessa når blastocyststadiet (Krisher, 2013).

### **Polyklorerade bifenyler, PCB**

Polyklorerade bifenyler (PCB) är industrikemikalier som kemiskt tillhör gruppen klorerade kolväten. De flesta är lukt- och färglösa kristaller bestående av en till tio kloratomer bundna till bifenyl. Tillverkningen av PCB började under 1930-talet kommersiellt som komplexa blandningar för bruk inom en rad olika användningsområden som elektrisk isolering, värmeledningsvätskor, hydraulvätskor, smörjmedel, och som tillsatser i bekämpningsmedel, färg, bindemedel, tätningsmedel och i plaster (Robertson, 2001). De flesta producenter minskade eller stoppade produktionen helt under 1970-talet då restriktioner och förbud infördes. Emellertid återfinns höga nivåer av PCB fortfarande i miljön i jordmån, vattendrag, vattenlevande djur, däggdjur och människor över hela världen (Zhang *et al.*, 2012). 1978 förbjöd Sverige användningen av PCB i nya produkter, vilket sedermera skärptes så att all användning totalförbjöds år 1995 (Naturvårdsverket, 2017).

PCB och andra dioxin eller dioxinlika kemikalier är oerhört motståndskraftiga mot såväl fysisk, kemikalisk som enzymatisk nedbrytning (Zhang *et al.*, 2012) vilket gör dem till svårhanterliga persistenta miljöföroreningar (Bourez *et al.*, 2012). En nyckelegenskap är dess fettlöslighet, vilket leder till att PCB tas upp och bioackumuleras i fettväven hos levande organismer. På så sätt stiger halten ju högre upp i näringskedjan organismen är positionerad (Petriello *et al.*,

2018). Dessa organiska föroreningar har visat sig ha många olika skadliga effekter på djurs och människors hälsa kopplade till bland annat kardiovaskulär sjukdom, diabetes och fetma (Bourez *et al.*, 2012). Dioxin och dioxinlika ämnen som PCB ger även upphov till en mängd neurologiska, immunologiska, metabola, utvecklings- och reproduktionsstörningar hos både djur och människor som exponerats (Zhang *et al.*, 2012), delvis på grund av att likna vissa kroppsegna hormoner (Schechter *et al.*, 2006; Pocar *et al.*, 1999) och genom att verka som agonister eller antagonister påverka syntesen av hormoner, uttrycket av receptorer och deras affinitet (Krogenæs *et al.*, 1998). PCB kan exempelvis ha en östrogen eller antiöstrogen effekt beroende på dess kemiska struktur (Kraugerud *et al.*, 2010; Waller *et al.*, 1995; Safe, 1994). Dess cancerogena effekter är begränsat beskrivna, svårutredda och fortfarande omtvistade (Naturvårdsverket, 2017; Zani *et al.*, 2017; Renner, 1999), men 2015 uppklassade International Agency for Research on Cancer (IARC) PCB som "cancerogent för människor" från det tidigare "troligen cancerogent för människor" (Zani *et al.*, 2017).



Figur 3. Strukturformel PCB126  
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

PCB klassas in i en av två kategorier beroende på dess strukturella, kemiska och fysiologiska egenskaper – dioxinlika och icke dioxinlika. PCB126 (se figur 3) tillhör den dioxinlika gruppen och har den högsta relativa toxiciteten bland PCB, TEF=0.1 (Zhang *et al.*, 2012). Jämförelsevis har PCB169, den näst mest potenta i familjen, mindre än en tredjedel av PCB126s relativa toxicitet. De dioxinlika antar en plan struktur vilket i egenskap av toxicitet verkar genom samma mekanism

som polyklorerade dibensodioxiner/ dibensofuraner (PCDD/F). PCB är allmänt något mindre hydrofoba än PCDD/F, men likt PCDD/F är de med fler kloratomer generellt mer hydrofoba (Naturvårdsverket, 2013). De tolv dioxinlika PCB har tilldelats specifika Toxic Equivalence Factors (TEF) av World Health Organization (WHO), vilka indikerar deras dioxinlika toxicitet i jämförelse med 2,3,7,8-Tetraklordibenso-*p*-dioxin (TCDD), TEF=1. TEF är ett index framtaget på 1980-talet med syftet att enkelt jämföra toxiciteten bland ämnen inom dioxinfamiljen och använder TCDD, det mest toxiska dioxinpreparatet, som referensstandard (TEF=1) (Bhavsar *et al.*, 2008). TEF är till största delen grundat i ämnens affinitet till AhR (aryl hydrocarbon receptor), en vanlig transkriptionsfaktor i cellkärnan (Zhang *et al.*, 2012; Kraugerud *et al.*, 2010; Bhavsar *et al.*, 2008). Toxiciteten hos dioxiner och dioxinlika ämnen tros ha sitt ursprung genom aktiveringen av denna receptor, även om följderna nedströms inte är fullt utredda (Zhang *et al.*, 2012; Kraugerud *et al.*, 2010). Hög affinitet och ihållande aktivering av AhR på grund av långsam nedbrytning tros vara bidragande orsaker till den mängd olika organ- och artberoende sjukdomstillstånd som uppstår (Zhang *et al.*, 2012). Trots sitt relativt lilla bidrag i olika PCB-blandningar viktligt, så är den toxiska potensen hos PCB126 det främsta bidraget till toxiciteten i dessa blandningar (Schmitz *et al.*, 1996).

### Förekomst i människokroppen

På grund av industriell tillverkning, användning samt som direkt och indirekt avfall har PCB spridit sig i miljön och via näringskedjan bioackumulerats. Människan, givet sin position i toppen av näringskedjan, exponeras huvudsakligen genom intag av kontaminerade livsmedel som fisk, kött, mjölk och mjölkprodukter (Hardell *et al.*, 2010). Föroreningarna har hittats i näst

intill alla marint levande djur- och växtarter, däggdjur, samt fåglar och deras ägg. De som arbetat inom PCB-produktion eller dess användningsområden kan ha exponerats i större mängder genom inhalation av gaser eller direkt hudkontakt (Robertson, 2001).

Förekomsten av olika typer av PCB i bland annat serum, fettväv och bröstmjolk har analyserats på flera befolkningsgrupper runt om i världen (Sun *et al.*, 2011; Hardell *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2007; Soechitram *et al.*, 2003). I en svensk studie uppmättes i medeltal 574 ng PCB per gram fett (prover från fettväv och blod). Dessutom tydliggjordes i samma studie en signifikant högre koncentration av PCB i fettvävnad i jämförelse med mängden i blod (Hardell *et al.*, 2010). I andra studier har beräkningarna istället utförts med Toxic Equivalent (TEQ) baserat på WHO's framtagna Toxic Equivalence Factors (TEF) nämnt ovan. I en studie på bröstmjolk i norra Kina sågs ökade halter av PCB när prov tagna 2007 jämfördes med prov från 2002 (Sun *et al.*, 2011). Motsatt trend visades i en studie på svenska kvinnor av Hardell *et al.* (2010) där koncentrationen istället minskade mellan prov tagna under perioden 1993–2007, troligtvis på grund av restriktioner och förbud mot användningen i västvärlden. Totala halter av PCB som uppmätts i follikelvätska var hos nötkreatur 3,05 ng/ml (Kamarianos *et al.*, 2003), och hos människa 1,22 ng/ml (Bloom *et al.*, 2017) i medelvärde, vilket antyder att PCB över tid ackumuleras även där. I en svensk studie (Lignell *et al.*, 2009) var medelvärdet av PCB126 i bröstmjolk 44 pg per gram fett från mödrar i Uppsala mellan 1996–2006. Trenden över tid visade på minskade halter.

## **PCB och reproduktion**

PCB kan påverka fertiliteten negativt hos både djur och människor (Pocar *et al.*, 2006; Axmon *et al.*, 2004). PCB är ett hormonellt aktivt ämne (Law *et al.*, 2005), och har associerats med bland annat påverkan på menstruationscykeln hos kvinnor (Mendola *et al.*, 1997), händelser av spontana aborter (Gerhard *et al.*, 1998) samt störningar i både fertilitet och embryoutveckling (Santos *et al.*, 2014). I studier utförda på djur ses färre antal dräktigheter samt ökade antal aborter efter oralt PCB-intag (Golub *et al.*, 1991; Arnold *et al.*, 1990; Barsotti *et al.*, 1976). Forskningsresultaten är i flera fall även icke-konklusiva eller tvetydiga (Yang *et al.*, 2008; Toft *et al.*, 2004; George *et al.*, 1988) av orsaker som exempelvis mätmetoders individuella känslighet, tidpunkten för mätningen och interaktionen kemikalier emellan, vilket gör det svårt att dra slutgiltiga slutsatser från exponeringsstudier *in vitro*. Många resultat har också demonstrerats i laboriemiljö med exponeringar långt över de faktiska exponeringarna uppmätta i olika populationer (Toft *et al.*, 2004; George *et al.*, 1988). I en *in vitro* studie (Krogenæs *et al.*, 1998) med nötoocyter som modell studerades effekten av PCB126 i mognadsmedium med koncentrationerna 1,006 pg/ml, 10,6 pg/ml samt 100,6 pg/ml. I den studien framkom att mängden utvecklade blastocyster var lägre vid samtliga behandlingar med PCB126 jämfört med kontrollgruppen, och oocytmognaden lägre i den högsta koncentrationen av PCB126.

## **Oocyter från nötkreatur som studiemodell**

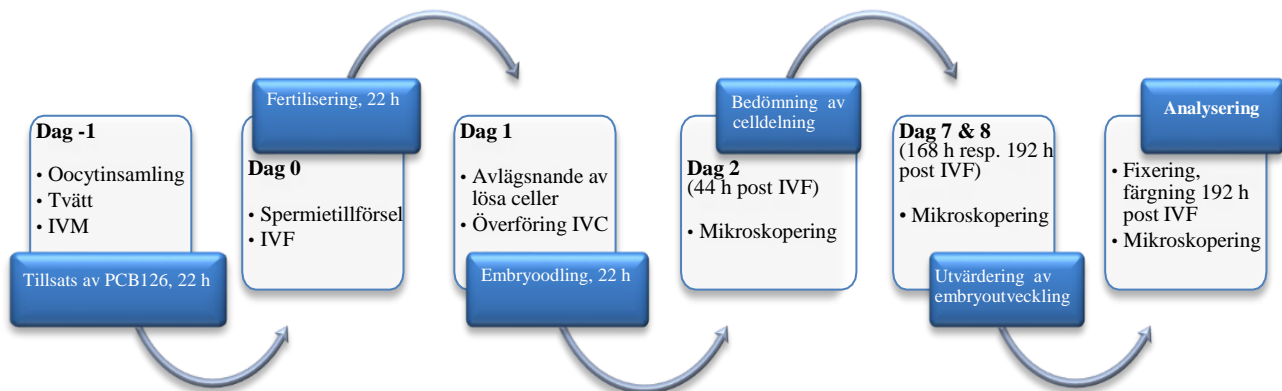
För närvarande är studier inom reproduktionstoxikologi likt de flesta studier mest tillförlitliga då de utförts på levande försöksdjur. En modernare metod som föreslagits vara ett värdefullt alternativ till djurförsök inom reproduktionstoxikologi är försök där man använder oocyter från nötkreatur. Oocyter från nöt har använts i ett flertal studier och laboratorier som en modell för humana oocyter under IVM, IVF och IVP (Tessaro *et al.*, 2015; Beker van Woudenberg *et al.*, 2012; Luciano *et al.*, 2010). Utvecklingstoxikologiska studier *in vivo* utövas traditionellt ofta

på gnagare vilket har visat sig vara en svagare djurmodell för att dra paralleller till human reproduktion i och med skillnader i oocytmognaden och själva fertiliseringen. Gris- och nötm modeller har visat sig ha fler likheter med en human modell i jämförande aspekter som oocytmognad, -storlek och tiden fram till blastocyststadium. Dessutom finns stora likheter i embryoutvecklingen, -metabolismen, dräktighetslängden och den anovulatoriska perioden hos nötkreatur och människa. Djurförsök *in vivo* kan emellertid inte helt elimineras ännu, men modellerna fungerar i många fall som ett värdefullt och tillförlitligt alternativ. Om oocyterna dessutom kommer från äggstockar tagna under slakt i livsmedelskedjan efterlevs principerna om ”3R” (*replacement, reduction and refinement*: ersätta, minska och förbättra) (Santos *et al.*, 2014) eftersom inga djur avlivats enbart i försökssyfte.



## MATERIAL & METODER

### Studiedesign – översikt



Figur 4. Schematisk översikt över arbetsgången. in vitro-mognad (IVM), in vitro-fertilisering (IVF), in vitro-odling (IVC).

### Utförande

Val av metod samt utförandet är baserat på, och i enlighet med de standardiserade protokoll som finns beskrivna för IVP (Abraham *et al.*, 2012), med undantaget att kommersiellt tillgängliga media användes istället för egenframställda. Egentillverkade media användes endast vid oocytinsamling, förflyttning och tvättning ("Sökmedium"). Studiedesignen beskrivs översiktligt i figur 4.

### Kommersiella produkter

All media som användes i försöket tillhandahölls av IVF Bioscience® (Falmouth, England, UK) om inget annat angivits. All media lagrades i kyl och förbereddes i inkubator med uppvärmning och gasning till 38,5°C och 5,5 % CO<sub>2</sub> under minst två timmar innan användning. Undantagen är Sökmedium och Semen Prep® som endast värmdes i värmeskåp under normala atmosfärsförhållanden. Sökmedium tillreddes på plats (se tabell 1), och tillhandahölls således inte av IVF Bioscience®. De brunnar och skålar som användes tillhandahölls av Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). För IVM, IVF och IVC användes fyrbrunnsskålar (Nunc™ #179830). För sök, förflyttning och tvätt av oocyter och embryon användes petriskålar (Nunc™ #150270, 150255).

### Oocytinsamling

Äggstockar från kor och kvigor samlades in från ett slakteri, förvarades i uppvärmd 0,9 % NaCl-lösning i en försluten behållare och transporterades till laboratoriet inom 4 timmar i värmebox. Temperaturen i behållarna hölls något under kroppstemperatur för att förhindra oocyternas mognadsprocess i folliklarna under transportereringen, och varierade vid ankomst mellan 28–32,5°C. Under insamlingen från livsmedelskedjan uteslöts inga individer på grund av ålder eller ras. Äggstockarna sköljdes vid ankomst i förvärm 0,9 % NaCl-lösning och flyttades till en ny behållare med 0,9 % NaCl-lösning uppvärmd till 35°C. Cumulus-oocyte-komplex (COCs) sögs ut med 10 eller 20 ml-spruta och 18G kanyl från folliklar i storleksordningen 3–10 mm, vilka

överfördes till förvärmade samlingsrör innehållande sökmedium (se sammansättning nedan). Dessa rör höll önskad temperatur med hjälp av en värmeplatta (37°C) under hela prepareringen. Överflödiga follikelvätska avlägsnades och oocyterna och resterande vätska lades i en förvärmad 60 mm TC-skål innehållande sökmedium där lokalisering och urval av lämpliga oocyter gjordes under ljusmikroskop. Urvalet baserades på en vedertagen klassificering av oocyternas morfologi, graderat 1 – bra, 2 – eventuellt användbar och 3 – ej användbar (Hawk & Wall, 1994). För denna studie inkluderades endast COCs av grad 1–2.

### **Randomisering & behandling**

Efter urvalet indelades samtliga COCs slumpmässigt in i tre lika stora och morfologiskt lika grupper innehållande 27–45 ( $\bar{x} = 38$ ) COCs vardera; en behandlingsgrupp (P) med PCB126 löst i dimetylsulfoxid (DMSO) tillsatt i mognadsmediet, en grupp med endast DMSO (D), samt en kontrollgrupp (C) utan tillsatser i mognadsmediet. Då antalet och kvalitet av äggstockar från slakteriet varierade, varierade även det totala antalet COCs i olika omgångar. Förhållandet mellan oocyter av grad 1–2 varierade även naturligt inom äggstockarna i de olika omgångarna. Studien består av data insamlad från totalt sex separata omgångar, samtliga genomförda under oktober månad 2019. Totalt ingick 729 COCs i försöket.

### **Sökmedium**

Sökmedium (tabell 1) användes som förvaringsmedium vid utsugning av oocyter från folliklar, som tvättmedium vid förflyttning och vid sökning och uppdelning av COCs efter utsugning. Sökmedium tillreddes veckovis lokalt i laboratoriet. Osmolaritet och pH kontrollerades och justerades vid behov till 290–300 mOsmo samt 7,2–7,3 respektive. Mediet filtrerades sedan genom en filtreringsenhet med 0,2 µm porstorlek och förvarades i kyl (4°C). Minst två timmar innan användning förvärmades lösningen i värmeskåp (38°C) under normala atmosfärförhållanden.

Tabell 1. *Sammansättning sökmedium. Ingredienser från Sigma Aldrich, Stockholm, Sverige.*

Reaktant	Koncentration	#Sigma
TCM199 (Tissue Culture Medium 199) + Hepes	-	M7528
Albumin, bovine, 96–99 %, BSA (fraction V)	0,2 % w/v	A3311
Gentamicin stock (Gentamicin Sulfate salt)	50 µg/ml	G1264

### **In vitro mognad (IVM)**

BO-IVM®-medium användes under oocytmognad *in vitro*, efter att insamling, randomisering och fördelning av COCs i de olika grupperna P, D och C utförts. Under mognadsfasen tillreddes och tillsattes PCB126 (10 µg/l) samt DMSO (0,1 %) (förhållande 1:1) spädd med BO-IVM® till en koncentration på 10 µg/ml i de två första försöksomgångarna. Från och med omgång 3 till och med 6 tillsattes PCB126 i en lägre dos (5 µg/ml) i försöksgruppen (P). DMSO är ett polärt aprotiskt lösningsmedel som användes för att få en mer homogen lösning av PCB126 i försöksgruppen (P). För att kontrollera och utesluta eventuella effekter av DMSO på embryo-utvecklingen tillsattes samma mängd som i försöksgruppen (P) till en egen grupp (D). I

kontrollgruppen (C) användes endast det kommersiella mognadsmediet BO-IVM® utannågon tillsats. Oocyterna förvarades i mognadsmediet under 22 timmar i inkubator (38,5°C, 5,5 % CO<sub>2</sub>) innan fertiliseringen påbörjades. Som ett subjektivt mått på COC-expansionen gjordes en kontroll av denna 22 timmar efter mognadens början. Bedömningen av hur homogent cumuluscellerna omslöt oocyten var antingen god (lucker och jämn fördelning av cumuluscellerna) eller mindre god (tät och/eller ojämn fördelning av cumuluscellerna).

### **In vitro fertilisering (IVF)**

Efter 22 timmar i mognadsmedium fertiliserades oocyterna med spermier från en tjur med konstaterad fruktsamhet både *in vivo* och *in vitro*. Vid fertiliseringen *in vitro* förflyttades oocyterna till nya brunnar innehållande BO-IVF®-medium. BO-SemenPrep®-medium användes vid preparering av spermier. 250 µl-strån med sperma förvarat i flytande kväve tinades hastigt i ljummet vatten (35°C), tillsattes i 1 ml BO-SemenPrep® och centrifugerades under 5 minuter vid 328×g i två omgångar (Sorvall ST 8 centrifuge, Thermo Scientific Instruments Co, Ltd, Jiangsu, P.R. China). Överflödig vätska avlägsnades med pipett mellan omgångarna. Den kvarvarande dosen med spermier, ca 100 µl, späddes med 350 µl BO-IVF®. Spermiekoncentrationen beräknades med en Bürkerkammare, justerades och tillsattes till varje grupp så att spermiekoncentrationen i brunnen blev 2×10<sup>6</sup> spermier/ml medium. Spermiernas motilitet kontrollerades i mikroskop både efter upptining, centrifugering samt efter tillsättning till brunnen innehållande oocyterna och BO-IVF®. Oocyterna förvarades i fertiliseringsmediet under 22 timmar i inkubator (38,5°C, 5,5 % CO<sub>2</sub>) innan förflyttning.

### **In vitro embryoodling (IVC)**

Förflyttning av presumtiva zygoter och embryon från BO-IVF® inleddes med en kontroll av förekomsten av levande spermier. Samtliga oocyter pipetterades upp gruppvis till ett 15 ml centrifugeringsrör innehållande 1 ml sökmedium och skakades i en vortex under en minut i två omgångar för att avlägsna resterande spermier och cumulusceller kring oocyterna. Efteråt tvättades och räknades oocyterna i sökmediet för att sedan förflyttas till nya fyrbrunnspaltor innehållande BO-IVC® täckt med Oil®-olja för att förhindra avdunstning i nästa inkubator med atmosfärsförhållandet 38,5°C, 5,5 % CO<sub>2</sub> och 5,5 % O<sub>2</sub>.

### **Utvärdering av utvecklingsstadier**

44 timmar efter fertilisering kontrollerades celldelningen okulärt med hjälp av ljusmikroskop. Parametrar som analyserades var andelen delade embryon, samt andelen embryon som delat sig mer än en gång vid undersökningstillfället. Dag sju och åtta efter fertilisering utvärderades blastocystutvecklingen med hjälp av ljusmikroskop. Totalantalet embryon räknades i samtliga grupper och klassificerades individuellt som tidig blastocyst (blastocyst innehållande minst 25 % hålrum), blastocyst med över 50 % hålrum, expanderande eller expanderad blastocyst, samt blastocyst under kläckning (ej intakt zona pellucida) eller kläckt blastocyst (frigjord ur zona pellucida). Embryokvaliteten bedömdes och graderades okulärt med ljusmikroskop från 1–4 baserat på morfologiska kännetecken, Grade 1: Excellent or good, Grade 2: Fair, Grade 3: Poor och Grade 4: Dead or degenerated, allt enligt riktlinjer från International Embryo Transfer Society (IETS) (Stringfellow & Given, 2010). I den statistiska analysen grupperades vissa klassificeringar och kategorier tillsammans. Totalt ingick 729 COCs i försöket, men då samtliga väl-definierade blastocyster tillvaratogs för att ingå i en annan studie fixerades och färgades

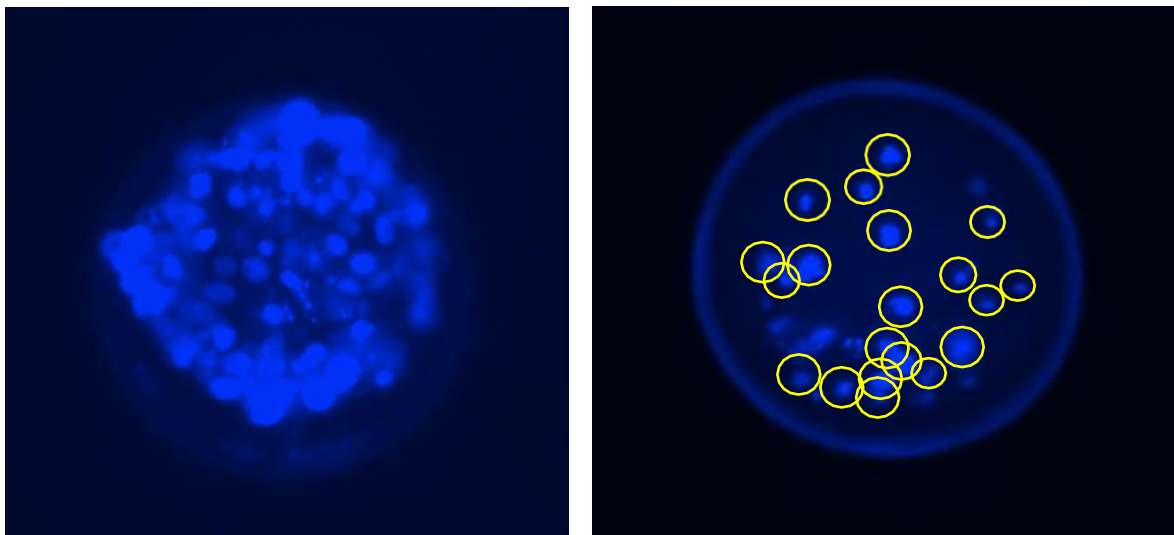
endast de resterande embryon/icke-befruktade oocyter. Insamlade data rörande utvecklingen av blastocysterna nämnda ovan ingår dock i denna studie.

### **Fixering & färgning**

De embryon och oocyter som fixerades och färgades för analys under ljusmikroskop bestod av de 408 stycken oocyter som inte tillvaratogs för att ingå i annan studie. Efter utvärderingen dag 8 fixerades de olika embryostadierna inför färgning med paraformaldehyd 2 % (PFA) i kyl (4°C) under natten. Tidigast nästföljande dag tvättades dessa i tre steg i brunnar innehållande fosfatbuffrad saltlösning (PBS) med 0,1 % polyvinylalkohol (PVA). Därefter pipetterades cellerna upp i en volym på 2 µl med vätska, och placerades i brunnar på ett svart tiobrunnsobjektglas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) tillsammans med 1 µl Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA) innehållande 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI). DAPI binder till nukleinsyrorna A-T på DNA och bildar ett fluorescerande komplex under UV-bestrålning {Kapusinski, 1995, DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe}, vilket gör cellkärnorna väldigt framträdande. Objektglaset täcktes omedelbart med täckglas som i kanterna förseglades med nagellack för att förhindra uttorkning, och förvarades mörkt under minst 20 minuter i rumstemperatur innan preparaten analyserades. Förvaring efter analys gjordes i ett svart, icketransparent objektglasemballage i kylskåp (4°C).

### **Analysering**

De olika utvecklingsstadiernas cellkärnor, som färgade med DAPI återger ett blått ljus i kombination med UV-ljus (se figur 5), räknades i fluorescensmikroskop (Nikon ECLIPSE Ts2R) i ett mörklagt rum. Denna analys gjordes subjektivt utan något bildhanteringsprogram av en och samma person i direkt anslutning till mikroskoperingen. Totalt färgades och analyserades 408 stycken oocyter och embryon.



Figur 5. Exempelbilder från mikroskoperingen. Cellkärnorna återger ett starkt blått ljus under UV-ljus. Till vänster: blastocyst med över 50 cellkärnor. Till höger: morula med 20 cellkärnor.

## Statistik

För att beräkna sambandet mellan behandlingen och utfallet av antalet delade embryon, utvecklingen av blastocyster, utvecklingsstadium och gradering användes logistisk regression med 95 % konfidensintervall (binomialfördelning, delad: ja/nej, blastocyst: ja/nej etc.). Inför den statistiska analysen klassades IETS-stadierna blastocyster med över 50 % hålrum samt expanderande eller expanderade blastocyster till "Stadie 1". "Stadie 2" består av blastocyster under kläckning och kläckta blastocyster. Embryon kvalitetsklassade enligt IETS som grad 1 klassades som "God". Embryon mellan grad 1,5–2,5 klassades som "Sämre". Omgång angavs som slumpmässig variabel för att ta hänsyn till eventuellt olika resultat mellan olika omgångar, och grupperna P och C jämfördes mot grupp D. Estimaterna från den logistiska regressionen omvandlades till oddskvoter (OR) för att mäta associationen mellan exponering och utfall. Linjär regression användes för beräkning av antalet kärnor samt antalet celldelningar med värdet logaritmerat för att anta normalfördelning. Omgång angavs som slumpmässig effekt, och grupperna P och C jämfördes mot grupp D.

P-värden  $<0,05$  ansågs vara signifikanta. Resultaten är presenterade som medelvärdet ( $\pm$ standardavvikelse, SD) om inget annat anges.

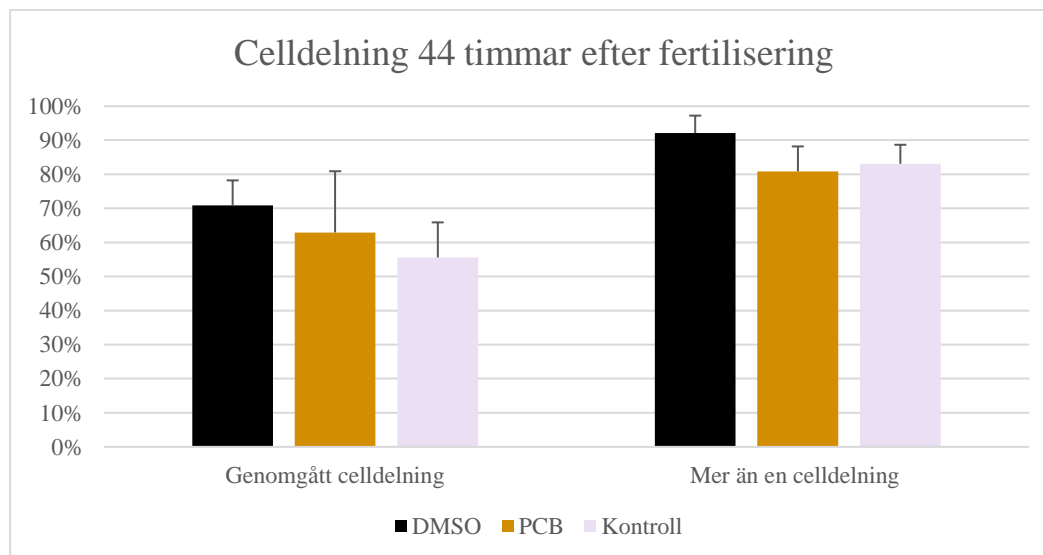
## RESULTAT

### *In vitro* embryoproduktion

Sammantaget inkluderades initialt 729 oocyter från totalt 6 olika omgångar att ingå i studien. Efter viss förlust vid hanteringen kvarstod 717 oocyter att analysera. Av dessa hade totalt 251 (35,0 %) utvecklats till blastocyster vid kontroll dag 8. Totalt användes 408 embryon till fixering och kärnfärgning, varav 118 st. ur grupp C, 136 st. ur D och 128 st. från grupp P.

### Celldelning

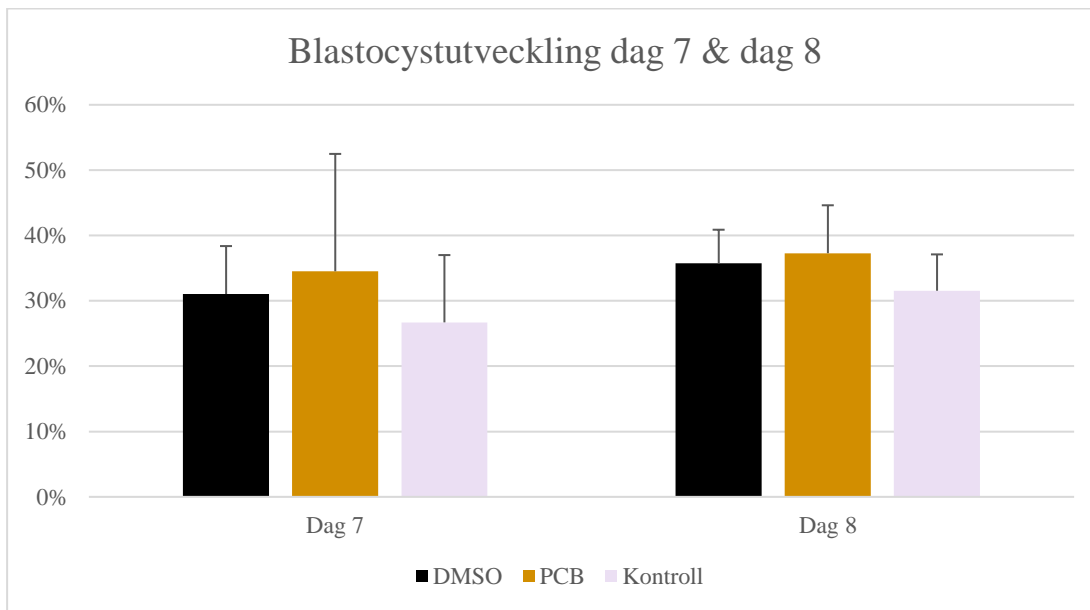
Procentuellt var celldelningen 44 timmar efter fertilisering 55,6 ( $\pm 10,3$ ) % i grupp C, varav 83,0 ( $\pm 5,6$ ) % hade delat sig mer än en gång. För grupp D var resultatet 70,9 ( $\pm 7,3$ ) %, samt 92,0 ( $\pm 5,1$ ) % mer än en gång. I grupp P hade 62,9 ( $\pm 18,0$ ) % delat sig, varav 80,1 ( $\pm 7,3$ ) % mer än en gång. I grupp C var celldelning signifikant lägre ( $p < 0,001$ ) jämfört med grupp D (OR = 0,5), men ingen signifikant skillnad mellan grupp P och D. Delning över tvåcellsstadiet (mer än en celldelning) var signifikant lägre för grupp C ( $p < 0,00005$ ), men även för grupp P ( $p < 0,005$ ) jämfört med grupp D (OR = 0,43 respektive OR = 0,58). Se figur 6.



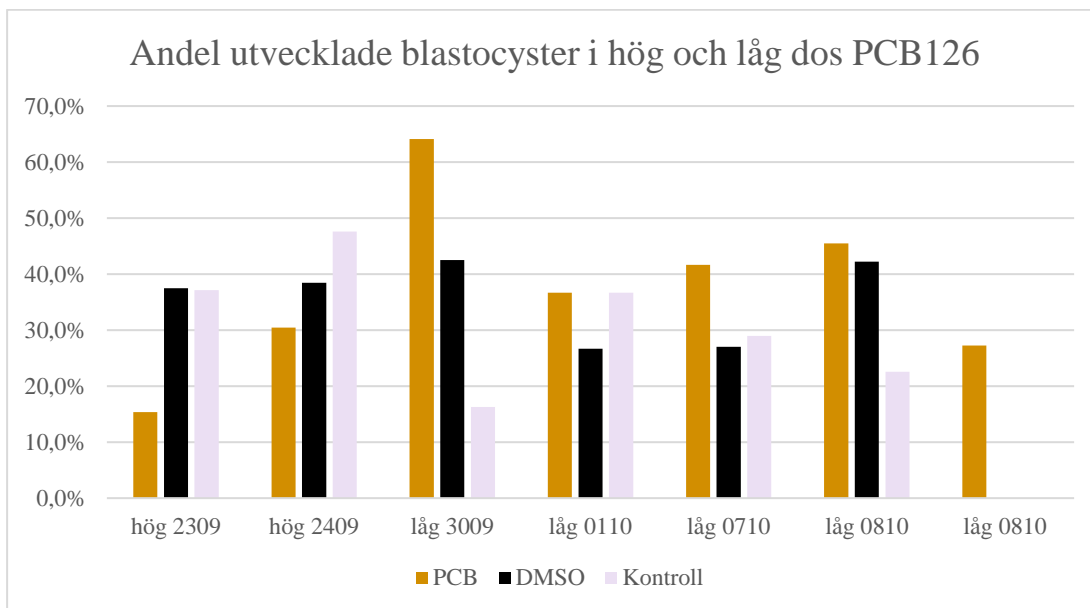
Figur 6. *Genomgått celldelning*: andel embryon av det totala antalet befruktade oocyter som genomgått celldelning 44 timmar efter fertilisering. *Mer än en celldelning*: relativ andel av alla delade embryon (Celldelning) som delat sig mer än en gång 44 timmar efter fertilisering (medel + SD).

### Utveckling av blastocyster

De fertiliserade oocyter som utvecklades vidare till blastocyster vid kontroll efter 7 och 8 dagar var i grupp C 26,8 ( $\pm 5,0$ ) % och 31,5 ( $\pm 10,3$ ) % respektive, i Grupp D 31,0 ( $\pm 11,3$ ) % och 35,7 ( $\pm 6,5$ ) %, samt i grupp P 34,5 ( $\pm 11,9$ ) och 37,2 ( $\pm 14,3$ ) % respektive. Ingen statistiskt signifikant skillnad gick att påvisa mellan grupp D och grupp C eller P, varken dag 7 eller dag 8. Se figur 7. I grupp P var graden utvecklade blastocyster så låg som 15 % i en omgång, jämfört med 64 % i en annan, trots samma koncentration av PCB126. En nästan lika stor spridning kunde ses i grupp C, där graden utvecklade blastocyster var så låg som 16 %, jämfört med 48 % i en annan omgång. I figur 8 är behandlingsgrupperna indelade efter omgångar med hög eller låg dos PCB126 i jämförande syfte. Sista omgången (0810) innehöll fler oocyter än vad som är optimalt för varje brunn vilket resulterade i en extra P-grupp.



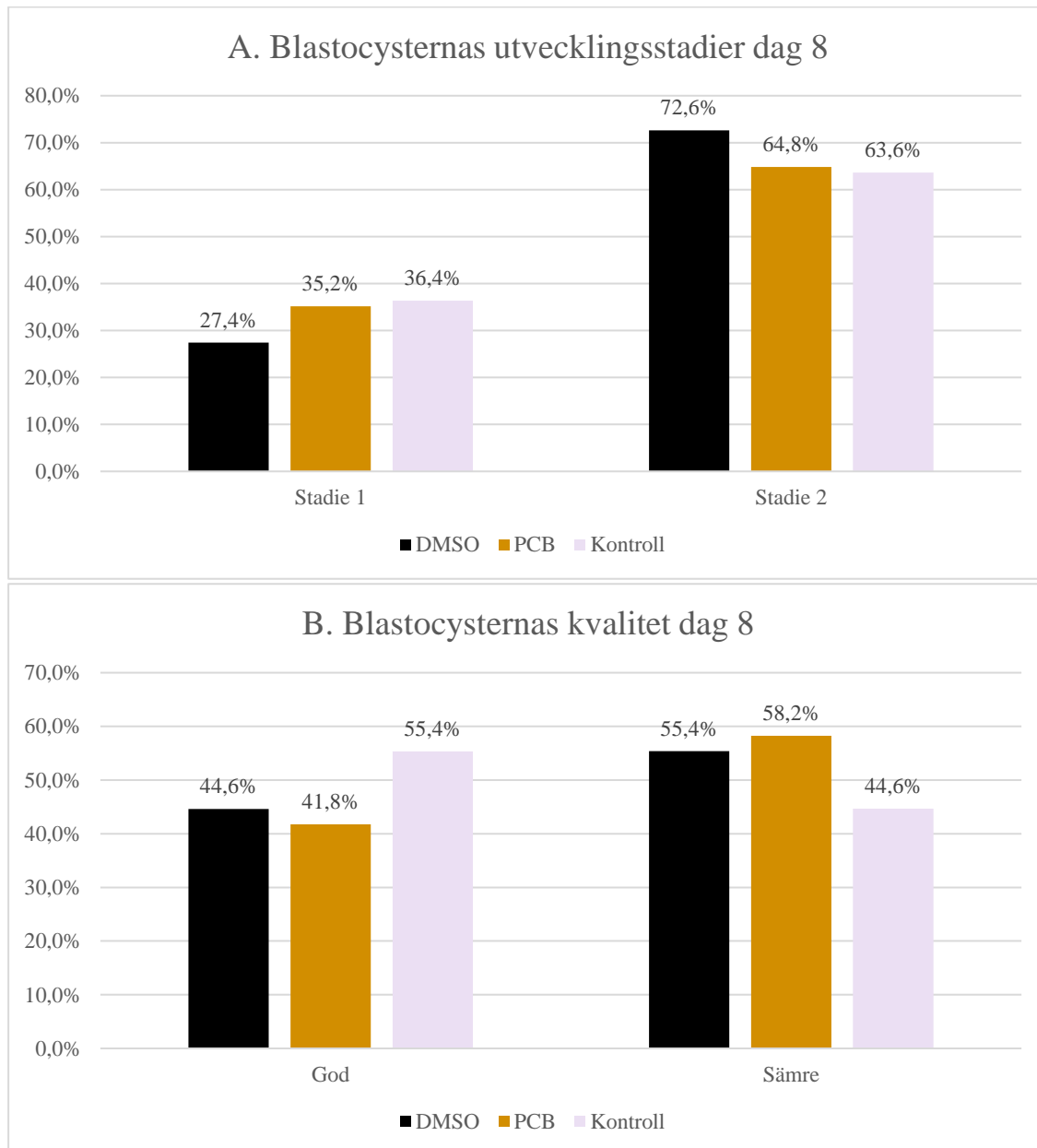
Figur 7. Andel utvecklade blastocyster dag 7 och dag 8 efter fertiliseringen (medel + SD).



Figur 8. Andel utvecklade blastocyster i de olika behandlingsgrupperna (2309–0810) uppdelat efter omgångar med hög (10 µg/ml) dos respektive låg (5 µg/ml) dos PCB126.

## Cellkärnor, stadium och gradering

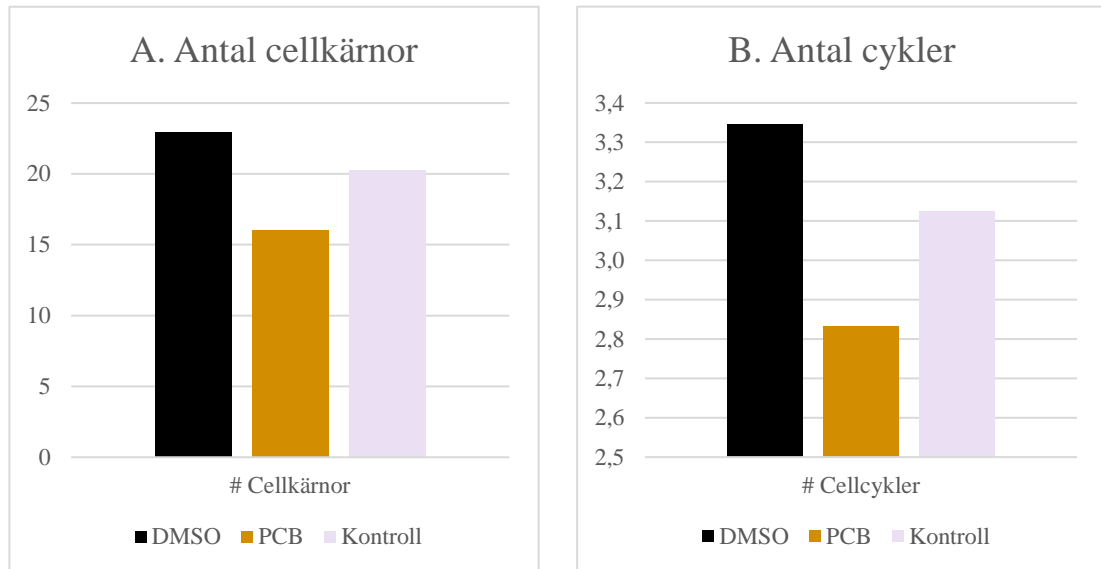
Ingen signifikant skillnad kunde påvisas mellan grupp D, C och P gällande utvecklingsstadium eller gradering dag 8. Se figur 9 A & B.



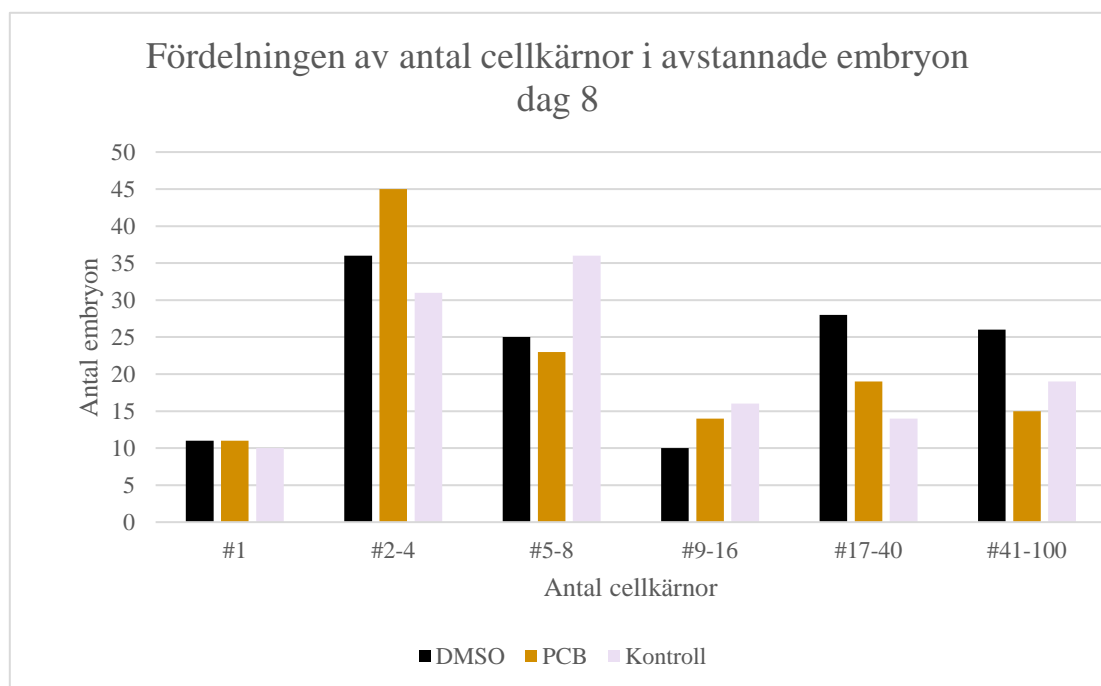
Figur 9. Jämförelse mellan blastocysternas utvecklingsstadier (A) och kvalitetsgradering (B). Stadie 1: blastocyst >50 % och expanderande/expanderad blastocyst. Stadie 2: blastocyst under kläckning och kläckt blastocyst. God: grad 1 blastocyst, Sämre: blastocyst grad  $\geq 1,5$ .



Bland dem som analyserades genom färgning var antalet cellkärnor och cykler i grupp P signifikant lägre än grupp D ( $p < 0,05$ ). Ingen signifikant skillnad mellan grupp C och D kunde påvisas. Se figur 10. I figur 11 åskådliggörs antalet avstannade embryon i de olika behandlingsgrupperna fördelat efter antal cellkärnor.



Figur 10. Jämförelse av (A) antal cellkärnor och (B) antal cykler (en cykel innebär en dubbling av antal cellkärnor) i de olika behandlingsgrupperna (medel).



Figur 11. Antalet avstannade embryon i de olika behandlingsgrupperna fördelat efter antal cellkärnor (1–100 st).

## DISKUSSION

### Studiedesign

Koncentrationerna av PCB126 i mognadsmediet var i denna studie 10 µg/ml i de första två omgångarna, och 5 µg/ml från omgång 3 till 6. Doserna bestämdes utifrån en exponeringsstudie gjord på zebrafiskembryon (Stefan Örn *et al.*, opublicerad data) där bedömningen var att 5-10 µg/ml under oocytmognaden hade effekt. Efter första försöken bedömdes koncentrationen vara för hög, vilken sedermera halverades till 5 µg/ml. Det är inte ovanligt att halterna *in vitro* skiljer sig från förhållandena *in vivo* när studier utförs (Laskowski *et al.*, 2016; Pocar *et al.*, 1999). I en liknande toxikologistudie av PCB126 *in vitro* (Krogenæs *et al.*, 1998) studerades koncentrationer från 1,006 till 100,6 pg/ml. Jämförelsevis var således koncentrationen i denna studie mellan 50 000 – 100 000 gånger högre än den högsta koncentrationen i studien av Krogenæs *et al.* (1998). Totala halten av de PCB som uppmätts i follikelväska i olika studier var hos nötkreatur 3,05 ng/ml (Kamarianos *et al.*, 2003), och hos människa 1,22 ng/ml (Bloom *et al.*, 2017) i medelvärde. I jämförelse med dessa var halten mellan 3300 - 8200 gånger högre i denna studie, och då av en enskild PCB. Angående PCB126 i blodet finns rapporterade nivåer inom intervallet 0,3–113 pg/g lipid (Kraugerud *et al.*, 2010), och medelvärdet av halten PCB126 i bröstmjölk var i en svensk studie (Lignell *et al.*, 2009) 44 pg/g lipid. Med tanke på att PCB126 endast utgör en liten mängd av den totala mängden PCB, kan antagandet göras att koncentrationerna i denna *in vitro* studie är väldigt höga kontra vad som uppmätts i serum, bröstmjölk och follikelväska *in vivo*. Dock är exponeringstiden i denna studie väldigt kort då oocyterna endast är exponerade i 22 timmar under mognadsfasen, jämfört med förhållanden *in vivo* där exponeringen hade förelegat under betydligt längre tid. Studieförloppet *in vitro* är begränsat då blastocysterna hade behövts transplanteras till livmodrar hos levande värdar för att följas vidare i embryoutvecklingen, något som inte var möjligt i denna studie. Eventuellt hade blastocyster som mognat i PCB126 och transplanterats resulterat i färre eller längre dräktigheter, fler antal aborter eller dödfödselar jämfört med de andra grupperna, liksom de resultat som presenterats i andra studier (Santos *et al.*, 2014; Pocar *et al.*, 2006; Gerhard *et al.*, 1998). Alternativt hade fler undersökningar av blastocysterna (RNA-uttryck, lipid-, mitokondrie-färgning m.fl.) kunnat bidra med mer information (Laskowski *et al.*, 2017). Den korta exponeringstiden till trots kunde några statistiskt signifikanta effekter av PCB126 påvisas.

Färgning och beräkning av cellkärnor är en metod för kvalitetsbedömning som använts i tidigare *in vitro*-studier (Laskowski *et al.*, 2017; Pocar *et al.*, 1999). Det finns svagheter med att manuellt räkna cellkärnor okulärt under ljusmikroskop, även om detta utförs av en och samma person. Delvis för summationseffekten som uppstår när en 3D-struktur, en cell, studeras i en 2D-miljö då cellkärnorna delvis summeras på varandra och blir svåra att avgränsa, och delvis på grund av osäkerheten i metoden då antalet cellkärnor blir svårare att räkna med stigande antal. Av den anledningen begränsades beräkningen av antal cellkärnor i en enskild cell till 100 stycken, och registrerades därefter som innehållande ”>100 st” cellkärnor. Detta har i sin tur sannolikt påverkat medelvärden och på så sätt även resultatet då dessa objekt registrerats som ”=100” för att kunna hanteras av de statistiska modellerna, oavsett om det i realiteten kunde ha handlat om betydligt fler cellkärnor i enskilda fall.

## Behandlingseffekter vid IVP

### Celldelning

Andelen celler delade mer än en gång (*fig. 5*) var signifikant lägre i grupp P jämfört med grupp D. Detta kan indikera att PCB126 har en toxisk effekt på den tidiga embryonala utvecklingen, men att detta inte gav tillräckligt utslag redan vid första celledelningen *in vitro*. Detta stärks av det lägre medeltalet cellkärnor (*fig. 9A*) och cykler (*fig. 9B*) som påvisades i grupp P efter färgningen, men stämmer inte överens med att antalet blastocyster dag 7 och 8 (*fig. 6*) inte skilde sig åt nämnvärt. En stor skillnad ses även mellan embryon innehållande 2–4 och 9–16 cellkärnor (*fig. 10*), vilket kan antyda att effekten är som mest påtaglig i perioden för MET. Det oväntade resultatet att proportionen delade oocyter, och proportionen delade mer än en gång (*fig. 5*) båda var signifikant lägre även i grupp C jämfört med grupp D kan delvis vara resultatet av en inadekvat randomisering mellan grupperna. Metoden som användes är en vedertagen standard från IETS (Hawk & Wall, 1994). Det finns dock en viss problematik med randomiseringen, då detta sker på strikt karaktäristiska grunder, och det faktum att det är omöjligt att i förväg säkerställa att grupperna är identiska gällande chansen att utvecklas till blastocyster även om oocyterna är morfologiskt lika och klassade som samma grad. Tillsatsen av DMSO har även visats bidra med en viss positiv effekt vid låga koncentrationer (<10 %) på blastocystmognad i IVP, men ger sämre resultat i högre koncentrationer (Ynsaurralde-Rivolta *et al.*, 2020; Ynsaurralde-Rivolta *et al.*, 2018; Ynsaurralde *et al.*, 2017; Stöhr *et al.*, 2016). Denna positiva effekt skulle kunna ha balanserat ut de negativa effekterna av PCB126 något, vilket resulterat i en falskt hög andel delade oocyter i grupp P. I studien av Krogenæs *et al.* (1998) tillsattes inte DMSO, utan istället användes etanol. Kanske kan detta delvis förklara skillnaden i resultatet studierna emellan.

### Blastocystutveckling, stadie och grad

Det observerades stora variationer i antalet utvecklade blastocyster mellan omgångarna inom vissa behandlingsgrupper. Denna spridning kan ha att göra med den naturligt varierande kvaliteten av äggstockar och tillhörande utsugna oocyter, resulterande i en varierande proportion oocyter av grad 1 och 2 i de olika omgångarna. En omgång kunde således innehålla färre oocyter av grad 1, och istället fler av grad 2 med sämre förutsättningar att utvecklas till blastocyster (Hawk & Wall, 1994). Ingen signifikant skillnad kunde påvisas i antalet utvecklade blastocyster dag 7 och 8 mellan grupperna. Detta resultat var oväntat och överensstämmer inte väl med de fynd som gjorts i liknande studier. I studien av Krogenæs *et al.* (1998) exponerades oocyter för PCB126 under 24 timmar. Trots mycket lägre koncentrationer jämfört med denna studie fastslogs att mängden utvecklade blastocyster i samtliga koncentrationer var lägre jämfört med kontrollgruppen, även om inget dosberoende samband kunde påvisas. Samma slutsatser drogs i studien av Pocar *et al.* (1999) vid mognad i PCB-blandningen Aroclor-1254. Något liknande kunde inte ses i denna studie, där det omvända istället tycktes ses i figur 7 över medeltalet blastocyster dag 7 och 8, om än inte statistiskt signifikant. Sett till innehållet i figur 8 över hög och låg dos PCB126 ses antydning till ett dos-responssamband där antalet utvecklade blastocyster i hög dos var lägre än vid låg. Statistiskt signifikant var heller inte skillnaden i utvecklingsstadier eller kvalitet mellan grupperna dag 8 (*fig. 9 A & B*), även om data visar tecken på lägre andel blastocyster av god kvalitet i behandlingsgrupp P.

### **Möjliga involverade mekanismer**

Olika toxiska mekanismer vid olika koncentrationer samt oklara samband mellan dos och respons är kännetecken för endokrinstörande substanser (Vandenberg *et al.*, 2017). Genom att likna kroppsegna hormoner (Schechter *et al.*, 2006; Law *et al.*, 2005; Pocar *et al.*, 1999) kan PCB och dess metaboliter fungera just endokrinstörande genom att påverka hormonsyntesen, antalet receptorer och deras affinitet. Endokrinstörande ämnen kan uppvisa helt olika toxiska effekter vid olika doser, och har sällan ett linjärt dos-responssamband vilket gör det svårt att förutsäga koncentrationens effekt som i vissa fall kan vara det helt motsatta (Vandenberg *et al.*, 2017). PCB126 har visat sig ha en östrogen effekt genom att öka syntesen av estradiol och progesteron, delvis via aktivering av AhR till vilken PCB126 har stark affinitet för (Kraugerud *et al.*, 2010). När PCB bryts ned i kroppen kan även de resulterande metaboliterna i många fall dramatiskt förändra den biologiska aktiviteten. Vissa PCB-metaboliter har till exempel visats ha en betydligt större östrogen effekt än sina intakta föregångare (Li *et al.*, 1994).

Cytoplasmatisk mognad (strukturella och rumsliga omfördelningar kemiska förändringar samt omfördelning av organeller i ooplaskan (Brevini Gandolfi & Gandolfi, 2001)) har visat sig vara fördröjd vid PCB-exponering (Campagna *et al.*, 2006; Brevini *et al.*, 2004; Pocar *et al.*, 2001a) på nöt- och grisocyter. Det finns även indikationer på att PCB påverkar den tidiga utvecklingen innan embryonal genaktivering (MET) inträffar, genom att påverka regleringen av mRNA efter transkriptionen. En tydlig relation har visat sig finnas mellan utvecklingsgraden hos embryon och specifika polyadenyleringsmönster, ett viktigt reglerande element i embryoutvecklingen (Brevini *et al.*, 2002). Resultaten visar att Aroclor-1254 (en kommersiell PCB-blandning) stör polyadenylering av ett stort antal gener (Pocar *et al.*, 2001a), vilket åtminstone delvis kunde förklara den bristande embryonala utvecklingsgraden. I en studie (Pocar *et al.*, 2001b) undersöktes effekterna av exponering med Aroclor-1254 i koncentrationer mellan 0,0001 till 1 µg/ml på nötkreaturoocyter under mognad *in vitro*. Där sågs en signifikant högre andel oocyter som inte fullföljde mognadsprocessen till metafase II (innan kromosomhalvering) som följde ett dosberoende mönster. Dessutom begränsades inte de negativa effekterna av exponeringen till endast mognaden, utan även till befruktning och ytterligare embryoutveckling även efter borttagandet av Aroclor-1254. Behandlingsgruppen visade en signifikant minskning av andelen embryon som vidareutvecklades. Trots högre koncentration i vår studie kunde inget liknande påvisas. En skillnad värt att nämna är att Aroclor-1254 är en blandning bestående av över 60 olika PCB (Pocar *et al.*, 2001b), så en synergistisk/additiv effekt kan inte uteslutas.

### **Konklusion**

Förståelsen kring de konkreta mekanismer bakom effekterna PCB126 skulle kunna ha på tidig embryonal utveckling *in vitro* är begränsad. Rådande konsensus verkar ändå vara att PCB har negativa konsekvenser på den tidiga embryoutvecklingen. Endokrinstörande ämnen är nästan uteslutande testade enskilt eller gruppvis med kemiskt liknande ämnen, men i verkligheten exponeras djur och människor kontinuerligt för många olika toxiska ämnen samtidigt, varav somliga bioackumuleras. Det är därför viktigt att avgöra konsekvenserna av den mängd olika toxiska ämnen vi exponeras för och dess möjliga additiva, synergistiska eller inhibitoriska effekter tillsammans med PCB126 på reproduktionen. Finns det en kritisk period i follikulo-

genesen där risken för skadlig effekt är högre? Vilka är de cellulära och molekylära mekanismerna som ligger till grund för de observerade effekterna i flertalet studier? Uppträder effekten innan eller efter MET? Det krävs både fler större studier *in vitro* på olika koncentrationer av enskilda PCB och olika PCB-blandningar, och *in vivo* för att studera effekterna under längre exponeringstider, varav det senare kan bedömas vara oetiskt. Därför är IVP ett viktigt verktyg även om det inte fullt ut kan spegla alla de komplexa fysiologiska förhållandena som råder *in vivo*. Andra typer av analyser, som genuttryck och ytterligare kärnfärgningar (exempelvis mitokondrie- och lipidfärgning) skulle kunna bidra med mer information gällande toxicitetens påverkan på olika celler.

# POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

## Inledning

Polyklorerade bifenyler (PCB) är industrikemikalier som i stora mängder började framställas under 1930-talet. PCB har funnits tillgängligt som komplexa kemiska blandningar i bland annat bekämpningsmedel, färg, plaster och olika elektriska komponenter. Deras kemiska struktur gör PCB till icke-vattenlösliga, extremt motståndskraftiga miljöföroreningar. På grund av miljöskäl och människors hälsa började så småningom begränsningar införas i användningen på 1970- och 80-talet, följt av ett totalförbud gällande både tillverkning och användning av PCB i många länder. Trots detta är PCB på grund av sin långa livslängd fortfarande dagsaktuella miljögifter som hittas i mark och vattendrag, samt nästan alla levande arter på jorden. Genom att t.ex. via maten utsättas för PCB har visat sig vara skadligt i många avseenden, men det är svårt att ta reda på vid vilka halter, efter hur lång tid eller varför de är skadliga. Bland de negativa hälsoeffekter som PCB orsakar eller misstänks orsaka, finns bland andra hormonella störningar, reproduktions- och utvecklingsrubbingar samt cancer. PCB delas upp i två kategorier beroende på dess kemiska egenskaper – dioxinlika eller icke dioxinlika. PCB126 tillhör de dioxinlika och är dessutom den mest giftiga i gruppen.

## Syfte och metod

Syftet bakom denna studie var att undersöka hur PCB126 påverkar den tidiga embryo-utvecklingen genom att tillsätta PCB126 i mognadsvätska med äggceller från nötkreatur. Äggcellerna samlades in ur äggstockar från ett slakteri. Genom insamling och bedömning av data över mognad, celldelning och embryoutveckling kunde möjliga effekter av PCB126 utvärderas. Äggceller från nöt har visat sig vara en betydligt bättre modell för att dra paralleller till människa, jämfört med de mer vanligt använda gnagaräggcellerna där skillnaderna rörande äggcellsmognaden är större. Insamlade äggceller delades slumpmässigt upp i tre olika grupper: en behandlingsgrupp (P) med PCB126 och dimetylsulfoxid (DMSO), en kontrollgrupp med endast DMSO (D) och en kontrollgrupp (C) utan några tillsatser i mognadsvätskan. DMSO fungerar som en typ av lösningsmedel för att jämnare fördela mängden fettlöslig PCB i vätskan. För att undvika felaktiga slutsatser på grund av eventuella effekter av DMSO tillsattes det till en egen grupp som kontroll (D). I de första två omgångarna tillsattes 10 µg/ml PCB126 och DMSO till mognadsvätskan. I de efterföljande fyra omgångarna halverades mängden PCB126 och DMSO till 5 µg/ml vardera. Äggcellerna fick mogna i vätskan under 22 timmar innan de befruktades och flyttades över till nya behållare innehållande fertiliseringsvätska. Efter ytterligare 22 timmar flyttades de nu befruktade äggcellerna till nya behållare innehållande odlingsvätska, där de fick ligga i 44 timmar för att sedan studeras i mikroskop. Under undersökningstillfället kontrollerades celldelningen: andelen delade embryon samt andelen embryon som delat sig mer än en gång. Dag sju och åtta efter fertilisering utvärderades blastocystutvecklingen med hjälp av ljusmikroskop. Totalantalet embryon räknades i samtliga grupper, klassificerades utefter utvecklingsgrad samt kvalitetsbedömdes och graderades utifrån utseendemässigakännetecken. De äggceller och embryon som vid bedömningen var oklara eller hade stannat av i utvecklingen färgades med en speciell kärnfärg, och cellkärnorna räknades under ljusmikroskop. Studien bestod av sex separata omgångar genomförda under oktober 2019, innehållande totalt 729 stycken äggceller. Av dessa färgades och räknades cellkärnorna på 408 stycken embryon. Sambandet mellan behandling och utfall beräknades med hjälp av

statistiska modeller.

## **Resultat**

Ingen betydlig skillnad kunde ses i andelen utvecklade blastocyster, blastocyststadie eller -kvalitet grupperna emellan. Bland dem som bedömdes genom färgning hade embryon i behandlingsgrupp P inte kommit lika långt i utvecklingen i jämförelse med grupp D, då antalet cellkärnor och cykler i grupp P vara betydligt lägre än i grupp D. Ingen signifikant skillnad mellan grupp C och D kunde påvisas. Även delning över tvåcellsstadie 44 timmar efter fertilisering var betydligt lägre i grupp P, men även i grupp C jämfört med grupp D. Celldelningen 44 timmar efter fertilisering var i grupp C signifikant lägre jämfört med grupp D. Ingen signifikant skillnad sågs här mellan grupp P och D.

## **Slutsatser**

Sammanfattningsvis verkar det finnas tecken på att PCB126 kan påverka tidig embryoutveckling negativt, vilket stämmer väl överens med många andra studier i området även om förståelsen varför är begränsad. I verkligheten utsätts äggceller för olika PCB och andra kemikalier under betydligt längre tid än i denna studie, där exponeringen endast inträffade vid en begränsad del av äggcellens mognadsfas. Skadligheten skulle delvis kunna bero på att olika hormonsystem sätts ur balans genom att PCB126 liknar kroppsegna hormoner. Fler studier behövs på olika typer av PCB och olika PCB-blandningar för att kunna peka ut varför, vid vilka halter och i vilka sammanhang de är skadliga.

## REFERENSER

- Abraham, M.C., Gustafsson, H., Ruete, A. & Brandt, Y.C. (2012). Breed influences on in vitro development of abattoir-derived bovine oocytes. *Acta Veterinaria Scandinavica* 54(1), 36.
- Arnold, D.L., Mes, J., Bryce, F., Karpinski, K., Bickis, M.G., Zawidzka, Z.Z. & Stapley, R. (1990). A pilot study on the effects of Aroclor 1254 ingestion by rhesus and cynomolgus monkeys as a model for human ingestion of PCBs. *Food and Chemical Toxicology* 28(12), 847-857.
- Axmon, A., Rylander, L., Strömberg, U., Jönsson, B., Nilsson-Ehle, P. & Hagmar, L. (2004). Polychlorinated biphenyls in serum and time to pregnancy. *Environmental Research* 96(2), 186-195.
- Barsotti, D.A., Marlar, R.J. & Allen, J.R. (1976). Reproductive dysfunction in rhesus monkeys exposed to low levels of polychlorinated biphenyls (Aroclor 1248). *Food and Cosmetics Toxicology* 14(2), 99-103.
- Beker van Woudenberg, A., Gröllers-Mulderij, M., Snel, C., Jeurissen, N., Stierum, R. & Wolterbeek, A. (2012). The bovine oocyte in vitro maturation model: A potential tool for reproductive toxicology screening. *Reproductive Toxicology* 34(2), 251-260.
- Bhavsar, S.P., Reiner, E.J., Hayton, A., Fletcher, R. & Macpherson, K. (2008). Converting Toxic Equivalents (TEQ) of dioxins and dioxin-like compounds in fish from one Toxic Equivalency Factor (TEF) scheme to another. *Environment International* 34(7), 915- 921.
- Bloom, M.S., Fujimoto, V.Y., Storm, R., Zhang, L., Butts, C.D., Sollohub, D. & Jansing, R.L. (2017). Persistent organic pollutants (POPs) in human follicular fluid and in vitro fertilization outcomes, a pilot study. *Reproductive Toxicology* 67, 165-173.
- Bourez, S., Le Lay, S., Van den Daelen, C., Louis, C., Larondelle, Y., Thomé, J.-P., Schneider, Y.-J., Dugail, I. & Debier, C. (2012). Accumulation of polychlorinated biphenyls in adipocytes: selective targeting to lipid droplets and role of caveolin-1 (PCB intracellular targeting in adipocytes). *PLoS ONE* 7(2), e31834.
- Brevini Gandolfi, T.A.L. & Gandolfi, F. (2001). The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology* 55(6), 1255-1276.
- Brevini, T.A.L., Lonergan, P., Cillo, F., Francisci, C., Favetta, L.A., Fair, T. & Gandolfi, F. (2002). Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. *Molecular Reproduction and Development* 63(4), 510-517.
- Brevini, T.A.L., Vassena, R., Paffoni, A., Francisci, C., Fascio, U. & Gandolfi, F. (2004). Exposure of pig oocytes to PCBs during in vitro maturation: effects on developmental competence, cytoplasmic remodelling and communications with cumulus cells. *European Journal of Histochemistry* 48(4), 347.
- Britt, J.H. (1992). Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. In: *Proceedings of the 24<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Bovine Practitioners*, September 18-21, 1991, Orlando, pp. 39-43.
- Campagna, C., Bailey, J.L., Sirard, M.A., Ayotte, P. & Maddox-Hyttel, P. (2006). An environmentally-relevant mixture of organochlorines and its vehicle control, dimethylsulfoxide, induce ultrastructural alterations in porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 73(1), 83-91.
- George, C.J., Bennett, G.F., Simoneaux, D. & George, W.J. (1988). Polychlorinated biphenyls a



- toxicological review. *Journal of Hazardous Materials* 18(2), 113-144.
- Gerhard, I., Daniel, V., Link, S., Monga, B. & Runnebaum, B. (1998). Chlorinated hydrocarbons in women with repeated miscarriages. *Environmental Health Perspectives* 106(10), 675-681.
- Golub, M.S., Donald, J.M. & Reyes, J.A. (1991). Reproductive toxicity of commercial PCB mixtures: LOAELs and NOAELs from animal studies. *Environmental Health Perspectives* 94, 245-253.
- Gordon, I. (2003). *Laboratory Production of Cattle Embryos*. 2nd ed. Oxon, UK: CABI Pub. (Biotechnology in agriculture series; 27).
- Hardell, E., Carlberg, M., Nordström, M. & van Bavel, B. (2010). Time trends of persistent organic pollutants in Sweden during 1993–2007 and relation to age, gender, body mass index, breast-feeding and parity. *Science of the Total Environment* 408(20), 4412-4419.
- Hawk, H.W. & Wall, R.J. (1994). Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 41(8), 1571-1583.
- Kamarianos, A., Karamanlis, X., Goulas, P., Theodosiadou, E. & Smokovitis, A. (2003). The presence of environmental pollutants in the follicular fluid of farm animals (cattle, sheep, goats, and pigs). *Reproductive Toxicology* 17(2), 185-190.
- Kapuscinski, J. (1995). DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry* 70(5), 220-233.
- Kraugerud, M., Zimmer, K.E., Dahl, E., Berg, V., Olsaker, I., Farstad, W., Ropstad, E. & Verhaegen, S. (2010). Three structurally different polychlorinated biphenyl congeners (Pcb 118, 153, and 126) affect hormone production and gene expression in the human H295R in vitro model. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 73(16), 1122-1132.
- Krisher (2013). *Oocyte Physiology and Development in Domestic Animals*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Krogenæs, A.K., Nafstad, I., Skåre, J.U., Farstad, W. & Hafne, A.-L. (1998). In vitro reproductive toxicity of polychlorinated biphenyl congeners 153 and 126. *Reproductive Toxicology* 12(6), 575-580.
- Laskowski, D., Båge, R., Humblot, P., Andersson, G., Sirard, M.-A. & Sjunnesson, Y. (2017). Insulin during in vitro oocyte maturation has an impact on development, mitochondria, and cytoskeleton in bovine day 8 blastocysts. *Theriogenology* 101, 15-25.
- Laskowski, D., Sjunnesson, Y., Gustafsson, H., Humblot, P., Andersson, G. & Båge, R. (2016). Insulin concentrations used in in vitro embryo production systems: a pilot study on insulin stability with an emphasis on concentrations measured in vivo. *Acta Veterinaria Scandinavica* 58(Suppl 1), 66.
- Law, D.C.G., Klebanoff, M.A., Brock, J.W., Dunson, D.B. & Longnecker, M.P. (2005). Maternal Serum levels of polychlorinated biphenyls and 1,1-dichloro-2,2-bis(itp/it-chlorophenyl)ethylene (DDE) and time to pregnancy. *American Journal of Epidemiology* 162(6), 523-532.
- Li, M., Zhao, Y. & Hansen, L. (1994). Multiple dose toxicokinetic influence on the estrogenicity of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 53(4), 583-590.
- Lignell, S., Aune, M., Darnerud, P.O., Cnattingius, S. & Glynn, A. (2009). Persistent organochlorine and organobromine compounds in mother's milk from Sweden 1996–2006: Compound-specific temporal trends. *Environmental Research* 109(6), 760-767.

- Lindell, B. (2012). *The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals. 146, Polychlorinated Biphenyls (PCBs)*. Göteborg: Göteborgs universitet. (Arbete och hälsa, 2012:46 (1).
- Luciano, A.M., Franciosi, F., Lodde, V., Corbani, D., Lazzari, G., Crotti, G., Galli, C., Pellizzer, C., Bremer, S., Weimer, M. & Modina, S.C. (2010). Transferability and inter-laboratory variability assessment of the in vitro bovine oocyte maturation (IVM) test within ReProTect. *Reproductive Toxicology* 30(1), 81-88.
- Madan, P. (2011). Arrest or survive: A decision of the early preimplantation embryo that influences fertility. In: Moo-Young, M. (Ed.). *Comprehensive Biotechnology*, 2. ed. Chapter 4.38. Elsevier: Pergamon.
- Mendola, P., Buck, G.M., Sever, L.E., Zielezny, M. & Vena, J.E. (1997). Consumption of PCB-contaminated freshwater fish and shortened menstrual cycle length. *American Journal of Epidemiology* 146(11), 955.
- Naturvårdsverket (2013). *Karakterisering av PCB och PCDD/F i Östersjöns ytsediment : halter och källspårning med hjälp av multivariat mönsteranalys*. Stockholm: Naturvårdsverket. (Rapport/ Naturvårdsverket, 6581).
- Naturvårdsverket (2017). *National implementation plan for the Stockholm Convention Sweden update 2017*. Stockholm: Swedish Environmental Protection Agency. (Report/ Naturvårdsverket, 6794).
- Park, H., Lee, S.-J., Kang, J.-H. & Chang, Y.-S. (2007). Congener-specific approach to human PCB concentrations by serum analysis. *Chemosphere* 68(9), 1699-1706.
- Pedersen, E., Ebbenhøj, N., Göen, T., Meyer, H. & Jacobsen, P. (2016). Exposure to 27 polychlorinated biphenyls in the indoor environment of a workplace: a controlled bio- monitoring study. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 89(1), 43-47.
- Petriello, M.C., Hoffman, J.B., Vsevolozhskaya, O., Morris, A.J. & Hennig, B. (2018). Dioxin- like PCB 126 increases intestinal inflammation and disrupts gut microbiota and metabolic homeostasis. *Environmental Pollution* 242(Pt A), 1022-1032.
- Picton, H.M. (2001). Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 55(6), 1193-1210.
- Pocar, P., Brevini, T.A.L., Antonini, S. & Gandolfi, F. (2006). Cellular and molecular mechanisms mediating the effect of polychlorinated biphenyls on oocyte in vitro maturation. *Reproductive Toxicology* 22(2), 242-249.
- Pocar, P., Brevini, T.A.L., Perazzoli, F., Cillo, F., Modina, S. & Gandolfi, F. (2001a). Cellular and molecular mechanisms mediating the effects of polychlorinated biphenyls on oocyte developmental competence in cattle. *Molecular Reproduction and Development* 60(4), 535-541.
- Pocar, P., Perazzoli, F., Lauria, A. & Gandolfi, F. (1999). Effect on maturation and embryonic development of bovine oocyte exposure to PCBs during in vitro maturation. *Theriogenology* 51(1), 391-391.
- Pocar, P., Perazzoli, F., Luciano, A.M. & Gandolfi, F. (2001b). In vitro reproductive toxicity of polychlorinated biphenyls: Effects on oocyte maturation and developmental competence in cattle. *Molecular Reproduction and Development* 58(4), 411-416.
- Reece (2015). *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. 13th ed. Ames, Iowa: Wiley Blackwell.
- Renner, R. (1999). Researchers question statistical power of PCB cancer study. *Environmental Science & Technology* 33(9), 187A.

- Roberts, R.M. (2007). Interferon-tau, a Type 1 interferon involved in maternal recognition of pregnancy. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 18(5-6), 403-408.
- Robertson, H. (2001). *PCBs: Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects*. Lexington, Kentucky: University Press of Kentucky.
- Safe, S.H. (1994). Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 24(2), 87-149.
- Santos, R.R., Schoevers, E.J. & Roelen, B.A.J. (2014). Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. *Reproductive Biology and Endocrinology* 12(1), 117.
- Scaramuzzi, R.J., Baird, D.T., Campbell, B.K., Driancourt, M.A., Dupont, J., Fortune, J.E., Gilchrist, R.B., Martin, G.B., McNatty, K.P., McNeilly, A.S., Monget, P., Monniaux, D., Vi, ntilde, oles, C. & Webb, R. (2011). Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction, Fertility and Development* 23(3), 444-467.
- Schechter, A., Birnbaum, L., Ryan, J.J. & Constable, J.D. (2006). Dioxins: An overview. *Environmental Research* 101(3), 419-428.
- Schmitz, H.-J., Behnisch, P., Hagenmaier, A., Hagenmaier, H., Bock, K.W. & Schrenk, D. (1996). CYP1A1-inducing potency in H4IIE cells and chemical composition of technical mixtures of polychlorinated biphenyls. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 1(1), 73-79.
- Siracusa, G., Becarelli, S., Lorenzi, R., Gentini, A. & Di Gregorio, S. (2017). PCB in the environment: bio-based processes for soil decontamination and management of waste from the industrial production of *Pleurotus ostreatus*. *New Biotechnology* 39(PB), 232-239.
- Sjaastad, Ø.V., Sand, O. & Hove, K. (2016). *Physiology of Domestic Animals*. 3. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Soechitram, S.D., Chan, S.M., Nelson, E.A.S., Brouwer, A. & Sauer, P.J.J. (2003). Comparison of dioxin and PCB concentrations in human breast milk samples from Hong Kong and the Netherlands. *Food Additives & Contaminants* 20(1), 65-69.
- Stringfellow, D. & Givens, M.D. (2010). Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures. 4. ed. *International Embryo Transfer Society (IETS)*. Champaign, IL: IETS.
- Stöhr, J., Grothmann, H. & Wrenzycki, C. (2016). 55 Effect of dimethyl sulfoxide supplementation on bovine in vitro embryo development. *Reproduction, Fertility, and Development* 28(2), 157-158.
- Sun, S.-J., Kayama, F., Zhao, J.-H., Ge, J., Yang, Y.-X., Fukatsu, H., Iida, T., Terada, M. & Liu, D.-W. (2011). Longitudinal increases in PCDD/F and dl-PCB concentrations in human milk in northern China. *Chemosphere* 85(3), 448.
- Tessaro, I., Modina, S.C., Crotti, G., Franciosi, F., Colleoni, S., Lodde, V., Galli, C., Lazzari, G. & Luciano, A.M. (2015). Transferability and inter-laboratory variability assessment of the in vitro bovine oocyte fertilization test. *Reproductive Toxicology* 51, 106-113.
- Toft, G., Hagmar, L., Giwercman, A. & Bonde, J.P. (2004). Epidemiological evidence on reproductive effects of persistent organochlorines in humans. *Reproductive Toxicology* 19, 5-26.
- Vandenberg, L.N., Luthi, D. & Quinerly, D.A. (2017). Plastic bodies in a plastic world: multi-disciplinary approaches to study endocrine disrupting chemicals. *Journal of Cleaner Production* 140(6), 373-385.
- Vorkamp, K. (2016). An overlooked environmental issue? A review of the inadvertent formation of

- PCB-11 and other PCB congeners and their occurrence in consumer products and in the environment. *Science of the Total Environment* 541, 1463-1476.
- Waller, C.L., Minor, D.L. & McKinney, J.D. (1995). Using three-dimensional quantitative structure-activity relationships to examine estrogen receptor binding affinities of polychlorinated hydroxybiphenyls. *Environmental Health Perspectives* 103(7-8).
- Yang, C.-Y., Wang, Y.-J., Chen, P.-C., Tsai, S.-J. & Guo, Y.L. (2008). Exposure to a mixture of polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans resulted in a prolonged time to pregnancy in women. *Environmental Health Perspectives* 116(5), 599-604.
- Ynsaurralde, A.E., Suvá, M., Bevacqua, R., Munilla, S., Luchetti, C. & Salamone, D.F. (2017). 186 Supplementation with low doses of dimethyl sulfoxide during in vitro maturation results in improved in vitro embryo production in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 29(1), 201.
- Ynsaurralde-Rivolta, A.E., Suvá, M., Bevacqua, R., Rodriguez-Alvarez, L., Velasquez, A., Briski, O. & Salamone, D. (2018). 165 Effect of dimethyl sulfoxide supplementation during in vitro maturation on the genetic expression pattern of bovine blastocyst. *Reproduction, Fertility and Development* 30(1), 222.
- Ynsaurralde-Rivolta, A.E., Suvá, M., Luchetti, C.G., Bevacqua, R.J., Munilla, S., Rodriguez- Alvarez, L., Velasquez, A., Briski, O., Lombardo, D. & Salamone, D. (2020). DMSO supplementation during in vitro maturation of bovine oocytes improves blastocyst rate and quality. *Theriogenology* 148, 140-148.
- Zani, C., Ceretti, E., Covolo, L. & Donato, F. (2017). Do polychlorinated biphenyls cause cancer? A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies on risk of cutaneous melanoma and non-Hodgkin lymphoma. *Chemosphere* 183, 97-106.
- Zhang, W.S., Sargis, R.M., Volden, P.A., Carmean, C.M., Sun, X.J. & Brady, M.J. (2012). PCB 126 and other dioxin-like PCBs specifically suppress hepatic PEPCK expression via the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS ONE* 7(5), 13.