

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Markéta DVOŘÁKOVÁ

Katedra veterinárních disciplín

**Vliv donoru sulfanu a česnekových derivátů na meiotické zrání a
stárnutí prasečích oocytů**

**The effects of a hydrogen sulfide donor and garlic derivatives on
the meiotic maturation and aging of porcine oocytes**

autoreferát doktorské disertační práce

Studijní program: P4103 Zootechnika

Studijní obor: 4103V002 Obecná zootechnika

Školitel: **prof. Ing. Mgr. Markéta SEDMÍKOVÁ, Ph.D.**
Katedra veterinárních disciplín

Konzultant: **Ing. Mgr. Tereza KREJČOVÁ, Ph.D.**
Katedra veterinárních disciplín

Oponenti:

Obhajoba doktorské disertační práce se koná dne 16. 9. 2016
v 10:00 hod. na Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU v
Praze

S doktorskou disertační prací je možno se seznámit na děkanátě FAPPZ ČZU
v Praze.

P r a h a 2 0 1 6

Summary

Oocyte meiotic maturation is a process of a transformation of the oocyte at the germinal vesicle stage to the oocyte at the stage of second meiotic metaphase. The product of successful meiotic maturation is the mature developmentally competent oocyte capable after fertilization by a sperm to develop into a viable embryo. The process called oocyte aging occurs when oocytes are exposed after the completion of meiotic maturation to the prolonged cultivation. This process is characterized by a decrease in oocyte quality. The addition of suitable compounds into the cultivation medium could improve the quality of maturing and aging oocytes.

Hydrogen sulfide is a gaseous signal molecule that is endogenously produced by the activity of enzymes cystathionine-beta-synthase, cystathionine-gamma-lyase and 3-mercaptopyruvate-sulfurtransferase. The presence of these enzymes has been proven for example in uterine, placenta and follicular cells.

Garlic derivatives are sulfur compounds capable of releasing hydrogen sulfide in organisms. They exhibit many positive effects on organisms; they have antimicrobial, antioxidative and antiproliferative properties. Alliin and S-allyl cysteine are important garlic derivatives.

We hypothesize that the quality of oocytes in the *in vitro* cultivation system can be improved by the addition of the hydrogen sulfide donor and garlic derivatives into the cultivation medium. The aim of the study was to evaluate the effects of hydrogen sulfide and garlic derivatives on the meiotic maturation of oocytes, the effects of hydrogen sulfide on oocyte aging and the effects of cultivation with hydrogen sulfide and garlic derivatives on early embryonic development.

It was found out that hydrogen sulfide donor accelerated oocyte nuclear maturation. Accelerated nuclear maturation was accompanied by an earlier increase of MPF and MAPK activities. Hydrogen sulfide donor suppressed the hyaluronic acid production during meiotic maturation and this effect of hydrogen sulfide was mediated by oocyte. The addition of hydrogen sulfide donor into maturation medium improved activating potential of oocytes.

It was found out that endogenous hydrogen sulfide production occurs during aging of porcine oocytes and that the hydrogen sulfide production decreases after first 24 hours of prolonged cultivation. Hydrogen sulfide donor completely suppressed fragmentation of oocytes exposed to prolonged cultivation. The inhibitors of hydrogen sulfide releasing enzymes impaired the quality of aged oocytes. Hydrogen sulfide donor improved the quality of aged oocytes treated simultaneously with the inhibitors of hydrogen sulfide releasing enzymes. The presence of

hydrogen sulfide donor during the prolonged cultivation of oocytes improved early embryonic development after parthenogenetic activation.

It was found out that alliin disrupted nuclear maturation of oocytes and S-allyl cystein had not influenced nuclear maturation, MPF and MAPK activities and the hyaluronic acid production during meiotic maturation. S-allyl cysteine accelerated the onset of embryo cleavage and reduced reactive oxygen species levels in maturing and parthenogenetically activated oocytes. On the basis of these results it can be concluded that the quality of oocytes in the *in vitro* cultivation system can be improved by addition of hydrogen sulfide donor and garlic derivative S-allyl cysteine into the cultivation medium.

Obsah

1 Literární přehled.....	5
2 Vědecké hypotézy a cíle práce	8
3 Materiál a metody.....	8
3.1 Kultivační podmínky.....	8
3.2 Hodnocení meiotického zrání a stárnutí oocytů	9
3.3 Hodnocení endogenní produkce sulfanu	10
3.4 Hodnocení produkce reaktivních forem kyslíku	10
3.5 Partenogenetická aktivace a hodnocení časného embryonálního vývoje.....	10
3.6 Statistická analýza	11
4 Výsledky a diskuze.....	11
4.1 Vliv donoru sulfanu na meiotické zrání prasečích oocytů a embryonální vývoj	11
4.2 Vliv sulfanu na průběh stárnutí prasečích oocytů	12
4.3 Vliv česnekových derivátů na meiotické zrání prasečích oocytů a embryonální vývoj	13
5 Závěry a doporučení.....	14
6 Seznam použité literatury.....	16
7 Seznam publikací autora k řešené problematice	20

1 Literární přehled

Během meiotického zrání oocyty dochází k přeměně plně dorostlého meioticky kompetentního oocyty v oplození schopný oocyt (Motlik *et* Fulka, 1986). Proces meiotického zrání začíná rozpadem jaderné membrány oocyty, který označujeme jako rozpad zárodečného váčku. Ve stádiu diakineze dochází ke shlukování kondenzovaného chromatinu. V metafázi I se chromozómy řadí v ekvatoriální rovině. V anafázi I dochází k rozchodu homologních chromozómů. V telofázi I dojde k vydělení prvního pólového tělíska. Meióza I přechází plynule v meiózu II bez replikace DNA. Meióza se zastavuje v metafázi II, čímž končí proces meiotického zrání (Wassarman, 1988).

M-fázi podporující faktor (MPF) je proteinový komplex cyklin-dependentní protein kinázy 1 (Cdk 1) a cyklinu B. Cdk 1 navozuje kondenzaci chromozómů, rozpad jaderného obalu a reorganizaci mikrotubulů při tvorbě dělicího vřeténka (Alberts *et al.*, 1998). Aktivní Cdk 1 musí být ve vazbě s cyklinem B a musí být fosforylována a defosforylována na specifických místech. Cdk 1 je aktivována náhle na konci interfáze odstraněním inhibičního fosfátu z její molekuly. Aktivní MPF komplex aktivuje na základě pozitivní zpětné vazby další MPF komplexy, čímž dochází k rychlému nárůstu kinázové aktivity (Nebreda *et al.*, 1995). Po dosažení metafáze I dochází k přechodnému poklesu aktivity MPF. Cyklin B je degradován ubiquitin-dependentním proteolytickým systémem. Reaktivace MPF vede k dosažení metafáze II a dokončení meiotického zrání (Hampl *et* Eppig, 1995). Aktivita MPF zůstává vysoká až do aktivace oocyty spermii a podílí se na udržení druhého meiotického bloku (Yanagimachi, 1988).

Mitogenem aktivovaná protein kináza (MAPK) je aktivní, je-li fosforylována na aminokyselinových zbytcích threoninu a tyrosinu (Alberts *et al.*, 1998). Signální dráha proteinů Mos a MEK vede k aktivaci MAPK. Aktivita MAPK v prasečích oocytech narůstá krátce před GVBD a zůstává vysoká po celou dobu meiotického zrání (Lee *et al.*, 2000). MAPK je nezbytná pro kondenzaci a segregaci chromozómů (Kishimoto, 2003), podílí se na fosforylaci mikrotubuly organizujícího centra a formaci dělicího vřeténka (Fan *et al.*, 2002). Její aktivita brání průběhu interfáze mezi meiózou I a II a s ní spojené replikaci chromozómů (Fan *et* Sun, 2004).

Souběžně s meiotickým zráním oocyty probíhá proces kumulární expanze. Kumulární buňky bezprostředně obklopující oocyt syntetizují komponenty extracelulární matrix, což vede ke zvětšování kumulárního obalu oocyty a k oddalování kumulárních buněk. Hyaluronová kyselina (HA) jako významný glykosaminoglykan expandovaného kumulatu přispívá

k oddalování kumulárních buněk během kumulární expanze (Nakayama *et al.*, 1996). Pro regulaci meiotického zrání kumulárními buňkami jsou klíčové spoje typu *gap junction*. Těmi proudí z kumulárních buněk do oocyty malé signální molekuly jako cyklický adenosin monofosfát (cAMP) (Yanagimachi, 1988). Kumulární expanze je doprovázená endocytózou proteinů buněčných spojů, které brání toku signálních molekul z kumulárních buněk do oocyty (Chen *et al.*, 1990). Produkce HA během procesu kumulární expanze pozitivně koreluje s úspěšností meiotického zrání *in vitro* (Qian *et al.*, 2003).

Jsou-li oocyty po dokončení meiotického zrání vystaveny prodloužené kultivaci, nastává proces označovaný jako stárnutí oocytů. Během stárnutí oocyty dochází ke změnám ve struktuře cytoplazmatické membrány (Szollosi, 1971) a vrstvy *zona pellucida* (Longo, 1981). V mitochondriích stárnoucího oocyty dochází ke změnám membránového potenciálu (Miao *et al.*, 2004). Dále dochází k přesunu kortikálních granul a jejich částečné exocytóze (Szollosi, 1971). Dochází k poruchám segregace chromozomů (George *et al.*, 1996) a tak ke zvýšenému výskytu aneuploidií (Mailhes *et al.*, 1998). Během stárnutí oocytů dochází ke změnám v aktivitě MPF a MAPK. Po dokončení meiotického zrání je nezbytné zachování vysoké aktivity MPF a MAPK pro udržení oocyty v druhém meiotickém bloku (Kikuchi *et al.*, 2000). Postupný pokles aktivity MPF a MAPK během prodloužené kultivace oocytů vede k výskytu nežádoucích jevů, jako jsou spontánní partenogenetická aktivace a fragmentace oocytů (Kikuchi *et al.*, 2000).

Během prodloužené kultivace oocytů dochází k nárůstu hladin ROS (Takahashi *et al.*, 2003) a vyčerpání zásob intracelulárních antioxidantů (Boerjan *et de Boer*, 1990), a stárnoucí oocyty jsou tak vystaveny oxidativnímu stresu. Oxidativní stres během stárnutí oocytů způsobuje pokles aktivity MPF, narušení homeostázy Ca^{2+} a funkce mitochondrií, což může vést až k apoptóze stárnoucích oocytů (Lord *et Aitken*, 2013). Stárnoucí oocyty tak vykazují sníženou oplozovací schopnost (Lanman, 1968), vnímavost vůči aktivačním stimulům (Szollosi, 1971), zvýšený výskyt polyspermií (Badenas *et al.*, 1989) a zhoršený embryonální vývoj (Lanman, 1968).

Sulfan patří spolu s oxidem dusnatým a oxidem uhelnatým mezi gasotransmitery. Gasotransmitery jsou malé plynné molekuly, které plní v organismu signální funkci. Sulfan je bezbarvý plyn silného zápachu. V organismu je endogenně produkován z aminokyseliny L-cysteinu aktivitou enzymů cystathionin-beta-syntázy (CBS), cystathionin-gama-lyázy (CSE) (Wang, 2002) a 3-merkaptopyruvát-sulfurtransferázy (3-MPST) (Shibuya *et al.*, 2009a). Fyziologicky se koncentrace endogenního sulfanu pohybují od 50 μ M do 160 μ M (Abe *et Kimura*, 1996). Sulfan vykazuje v řadě typů buněk antioxidační a antiapoptotické účinky

(Whiteman *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2015). Endogenně produkováný sulfan plní fyziologickou funkci v centrální nervové soustavě (Abe *et al.*, 1996), cévní soustavě (Zhao *et al.*, 2001) a samčí (Srilatha *et al.*, 2007) a samičí reprodukční soustavě (Srilatha *et al.*, 2009). Exprese enzymu CSE je nezbytná pro prokrvení placenty, působí proti rozvoji preeklampsie (Wang *et al.*, 2013) a je důležitá pro lubrikaci vaginální sliznice (Sun *et al.*, 2016). Exprese CBS a CSE ve vejcovodu zvyšuje jeho kontraktilitu a napomáhá posunu embrya (Ning *et al.*, 2014). Vysoká exprese CBS byla prokázána v myších folikulárních buňkách (Liang *et al.*, 2006). Potlačení exprese CBS v myších granulózních buňkách potlačuje zrání oocytů (Liang *et al.*, 2007).

Česnek je všeobecně známý svými pozitivními účinky v organismu. Za většinu pozitivních účinků česneku v organismu jsou zodpovědné sirné sloučeniny. Sirná sloučenina gama-glutamyl cystein, obsažená v neporušených česnekových palicích, podstupuje dvě významné reakce. Hydrolýzou a oxidací je přeměňován na alliin. Dlouhodobou extrakcí je účinkem enzymu gama-glutamyl transpeptidázy přeměněn na S-allyl cystein (SAC) (Corzo-Martinez *et al.*, 2007). Účinky česnekových derivátů jsou v řadě typů tkání zprostředkovány jejich schopností uvolňovat sulfan (Louis *et al.*, 2012).

Při drcení česnekových palic je alliin přeměněn účinkem enzymu allinázy na kyselinu sulfonovou, pyruvát a amoniak (Amagase, 2006). Kyselina sulfonová podstupuje kondenzační reakci s jinou molekulou téže kyseliny za vzniku allicinu (Lanzotti, 2006). Allicin se rychle rozkládá na diallyl sulfid (DAS) a polysulfidy, zejména diallyl disulfid (DADS) a diallyl trisulfid (DATS) (Miething, 1988). Alliin a z něj odvozené česnekové deriváty vykazují v organismu dvojí aktivitu v závislosti na dávce a typu tkáně; působí antiproliferativně, čehož je využíváno u nádorových buněk (Chhabria *et al.*, 2015; Izdebska *et al.*, 2016), a antioxidačně (Banerjee *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2013).

Během dlouhodobé extrakce česnekových palic v 15-20% etanolu vzniká vyzrálý česnekový extrakt (AGE – aged garlic extract). Gama-glutamylcystein, přítomný v neporušených česnekových palicích, je během procesu dlouhodobé extrakce přeměněn na S-allyl cystein (SAC) (Amagase, 2006). Sirné sloučeniny obsažené v AGE mají vyšší a stálejší protektivní účinky v organismu a jsou pro organismus bezpečnější ve srovnání se syrovým česnekem (Corzo-Martinez *et al.*, 2007). AGE představuje produkt úpravy česneku s nejvyšší antioxidační aktivitou (Geng *et al.*, 1997). SAC je hlavní složkou AGE a je tak pravděpodobné, že za největší část antioxidačních účinků česneku je zodpovědný právě SAC (Louis *et al.*, 2012).

Procesy meiotického zrání a oplození oocyty není možné studovat bez využití kultivace oocytů v *in vitro* podmínkách. *In vitro* kultivace oocytů s sebou nesou riziko variability řady faktorů stěžejních pro úspěšný průběh procesů meiotického zrání a oplození, jako jsou složení kultivačního média, pH, úroveň osvětlení (Takenaka *et al.*, 2007) a hladiny kyslíku (Agarwal *et al.*, 2003). Kultivační média jsou doplňována řadou látek, jako jsou séra (Esfandiari *et al.*, 2005), energetické zdroje (Hashimoto *et al.*, 2000) a homony (Markides *et al.*, 1998), které mohou narušit rovnováhu reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species). Zvýšené hladiny ROS v průběhu meiotického zrání oocytů narušují homeostázu Ca^{2+} , poškozují mikrofilamenta a narušuje redistribuci kortikálních granul, což zvyšuje pravděpodobnost polyspermiálního oplození (Jiao *et al.*, 2013). Vhodné nastavení *in vitro* kultivačních podmínek je významným faktorem, který ovlivňuje kvalitu oocytů.

2 Vědecké hypotézy a cíle práce

Byla stanovena hypotéza, že kvalitu prasečích oocytů kultivovaných v *in vitro* kultivačním systému lze zlepšit suplementací kultivačního média donorem sulfanu a česnekovými deriváty.

Pro ověření hypotézy byly stanoveny následující cíle:

- vyhodnotit vliv sulfanu na meiotické zrání prasečích oocytů,
- vyhodnotit vliv sulfanu na průběh stárnutí prasečích oocytů,
- vyhodnotit vliv česnekových derivátů na meiotické zrání prasečích oocytů,
- zhodnotit vliv kultivace se sulfanem a česnekovými deriváty na časný embryonální vývoj.

3 Materiál a metody

3.1 Kultivační podmínky

Kultivace kumulo-oocytárních komplexů

Kumulo-oocytární komplexy (COCs) byly získávány aspirací ovariálních folikulů o průměru 2 - 5 mm pomocí injekční stříkačky a jehly 20G. Pro kultivaci byly vybírány pouze COCs tvořené plně dorostlými oocyty o průměru 120 μ m a kompaktní vrstvou kumulárních buněk. COCs byly kultivovány v modifikovaném kultivačním médiu M199 (Sigma-Aldrich, USA) obsahujícím hydrogenuhličitan sodný (32,5 mM), laktát vápenatý (2,75 mM), gentamicin

(0,025 mg/ml), HEPES (6,3 mM), gonadotropní hormony eCG a hCG v poměru 13,5 I.U.: 6,6 I.U./ml (P.G.600; Intervet, Holandsko) a 10 % (v/v) fetálního bovinního séra (GibcoBRL; Life Technologies, Německo) (5 % CO₂, 39 °C). Oocyty byly kultivovány 24 hodin do stádia metafáze I a 48 hodin do stádia metafáze II. Pro podrobnější hodnocení meiotického zrání byly oocyty kultivovány 0 – 48 hod. a hodnoceny každé dvě hodiny.

Jako donor sulfanu byl použit Na₂S.9H₂O (Sigma-Aldrich, USA; 35; 70; 150; 300; 600; 900 μM). Jako inhibitor CBS byla použita kyselina oxamová (Sigma-Aldrich, USA; 1 mM), jako inhibitor CSE beta-kyano-L-alanin (Sigma-Aldrich, USA; 1 mM), jako inhibitor 3-MPST kyselina alfa-ketoglutarová (Sigma-Aldrich, USA; 5 mM). Použité česnekové deriváty byly alliin (Sigma-Aldrich, USA; 50; 100 μM) a S-allyl cystein (Sigma-Aldrich, USA; 0,1; 0,5; 1; 5 mM).

Kultivace stárnoucích oocytů

Oocyty ve stádiu metafáze II byly zbaveny kumulárních buněk a vystaveny prodloužené kultivaci v modifikovaném médiu M199 bez přídavku hormonů po dobu 24, 48 a 72 hodin za stejných podmínek jako COCs..

Oocytektomie

Oocytektomie byla provedena pomocí mechanického mikromanipulátoru (Narishige, Japonsko). COCs byly imobilizovány fixační kapilárou a oocyty byly odstraněny injekční kapilárou. Oocytektomované komplexy byly kultivované za stejných podmínek jako COCs.

3.2 Hodnocení meiotického zrání a stárnutí oocytů

Morfologické hodnocení jaderného zrání a stárnutí oocytů

Oocyty byly po dokončení kultivace zbaveny kumulárních buněk, fixovány v octové kyselině a ethanolu (1:3, v/v) a hodnoceny pod mikroskopem s fázovým kontrastem.

Při hodnocení jaderného zrání byly oocyty řazeny do kategorií: GV–zárodečný váček; LD–pozdní diakineze; MI–metafáze I; AITI–přechod z anafáze I do telofáze I; MII–metafáze II.

Při morfologickém hodnocení stárnutí byly oocyty řazeny do kategorií: intaktní oocyty – oocyty ve stádiu MII a AITI; aktivované oocyty – oocyty s formovanými prvojádry a embrya; fragmentované oocyty – oocyty s apoptotickými váčky pod *zonou pellucidou*; lytické oocyty – oocyty se změnami odpovídajícími lytickému zániku oocytů.

Hodnocení kinázové aktivity ve zrajících a stárnoucích oocytech

Kinázová esej byla provedena dle Kubelky *et al.* (2000). Specifické substráty MPF a MAPK, histon H1 a myelinový bazický protein, byly fosforylovány radioaktivně značeným izotopem 500 μCi/ml [γ -³²P]ATP (GE Healthcare Life Sciences, USA) a separovány pomocí SDS-

polyakrylamidové elektroforézy. Intenzita signálu byla odečtena pomocí scanaru FLA 7000 reader (GE Healthcare Life Sciences, USA) a softwaru Multi-Gauge 2.0 (Fujifilm, Japonsko).

Hodnocení produkce hyaluronové kyseliny (HA)

Vzorky byly vystaveny proteolytické digesci 30 μ l alkalázy 2.4 L FG v PBS (1:100 v/v, Novozymes, Dánsko; 2 hod.) a 30 μ l alkalázy Flavourzyme 1000 L (1:100 v/v, Novozymes, Dánsko; 3 hod.). Množství HA ve vzorcích bylo stanoveno za použití QnE Hyaluronic Acid ELISA Assay detection kit (Biotech, USA) a Rainbow ELISA plate reader (540 nm).

V průběhu řešení této práce byla na pracovišti KVD vyvinuta spektrofotometrická metoda měření produkce HA. Vzorky byly vystaveny digesci lyázou ze *Streptomyces hyaluronoticus* (20 μ l/ml; Sigma-Aldrich, USA) při 39 °C přes noc, centrifugovány (10 000 rpm, 5 min., 4 °C) a hodnoceny na spektrofotometru Helios Epsilon (Verkon, ČR; 216 nm).

3.3 Hodnocení endogenní produkce sulfanu

Oocyty byly rozrušeny v reakční směsi 5 μ l pyridoxal-5-fosfátu (Sigma-Aldrich, USA; 0,2 M) a 50 μ l L-cysteinu (Sigma-Aldrich, USA; 10 mM) (4 °C). Byl přidán acetát zinku (Sigma-Aldrich, USA; 1%, 250 μ l). Enzymatická reakce probíhala pod tekutým N₂ (60 min.; 37 °C). Byl přidán N,N-dimethyl-p-fenylendiamin sulfát (Sigma-Aldrich, USA; 20 mM v 7,2M HCl; 133 μ l) a FeCl₃ (Sigma-Aldrich, USA; 30 mM v 1,2M HCl; 133 μ l). Vzorky byly měřeny na spektrofotometru (670 nm).

3.4 Hodnocení produkce reaktivních forem kyslíku

Oocyty byly inkubovány s 2',7'-dichlorofluorescein diacetátem (Sigma-Aldrich, USA; 10 μ M; 20 min., 39 °C) a hodnoceny na konfokálním mikroskopu (Leica SPE, Německo; exc. 450 - 490 nm). Intenzita signálu byla měřena pomocí analýzy obrazu NIS Elements 4.0.

3.5 Partenogenetická aktivace a hodnocení časného embryonálního vývoje

Oocyty byly ošetřeny ionforem vápníku A23187 (Sigma-Aldrich, USA; 25 μ M, 5 min.), 6-dimethylaminopurinem (Sigma-Aldrich, USA; 2 mM, 2 hod.) a kultivovány v médiu M199 a NCSU23 (39 °C, 5 % CO₂). Časný embryonální vývoj byl hodnocen pod mikroskopem s fázovým kontrastem; aktivační potenciál byl hodnocen po 22 a 24 hod., časný rýhování bylo hodnoceno po 22 hod., rýhování bylo hodnoceno po 48 hod. a formace morul a blastocyst byla hodnocena po sedmi dnech.

3.6 Statistická analýza

Každý experiment byl opakován nejméně čtyřikrát. Výsledky experimentů byly podrobeny statistické analýze v programu SAS (SAS Institute Inc., USA) za použití testu ANOVA. P hodnota menší než 0,05 byla považována za statisticky významnou.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Vliv donoru sulfanu na meiotické zrání prasečích oocytů a embryonální vývoj

Bylo zjištěno, že donor sulfanu urychluje jaderné zrání oocytů. Donor sulfanu způsobil nárůst podílu oocytů, které prodělaly GVBD po 20 hodinách kultivace (80 % vs. 68,3 %) a nárůst podílu oocytů, které prodělaly přechod z meiózy I do meiózy II po 30 hodinách kultivace (86,7 % vs. 57,5 %).

Dále bylo zjištěno, že donor sulfanu způsobuje dřívější nárůst aktivity MPF a MAPK. Donor sulfanu zvýšil aktivitu MPF a MAPK v době, kdy byl pozorován nárůst podílu oocytů, které prodělaly GVBD. Donor sulfanu způsobil nárůst aktivity MPF po 22 hodinách kultivace a nárůst aktivity MAPK po 20 hodinách kultivace. Je tak pravděpodobné, že zrychlený průběh jaderného zrání pod vlivem donoru sulfanu je způsobený dřívějším vzestupem aktivity MPF a MAPK. Sulfan ovlivňuje cílové proteiny mechanismem sulfhydratace (Mustafa *et al.*, 2009). Sulfan tak může například sulfhydratovat některé proteiny regulující aktivitu MPF a MAPK v oocytu (Hu *et al.*, 2008).

Dále bylo zjištěno, že donor sulfanu potlačuje produkci hyaluronové kyseliny v průběhu meiotického zrání. Donor sulfanu potlačil celkovou produkci hyaluronové kyseliny po 36 hodinách kultivace o 13 % a po 48 hodinách kultivace o 29 %. Mechanismus, kterým sulfan působí na produkci hyaluronové kyseliny je dosud neznámý. Dříve již bylo prokázáno, že po dosažení metafáze I dochází k poklesu aktivity faktorů stimulujících produkci hyaluronové kyseliny (Nagyova *et al.*, 2000). Je možné, že donor sulfanu prohlubuje pokles aktivity těchto faktorů během meiózy II. Další možností je zapojení sulfanu do signální dráhy cAMP a protein kinázy A (Njie-Mbye *et al.*, 2012), která se podílí na regulaci procesu kumulární expanze (Eppig, 2001).

Dále bylo zjištěno, že inhibice kumulární expanze donorem sulfanu je zprostředkovaná oocytem. Oocytektomie snížila celkovou produkci hyaluronové kyseliny v kontrolní skupině o 37 %. Celková produkce hyaluronové kyseliny oocytektomovanými komplexy kultivovanými s donorem sulfanu se nelišila od produkce hyaluronové kyseliny v kontrolní skupině oocytektomovaných komplexů. Snížení produkce HA při kultivaci

oocytektomovaných komplexů lze vysvětlit tím, že proces kumulární expanze je z velké části regulován molekulami pocházejícími přímo z oocyty (Nagyova *et al.*, 2000). Autoři Kimura *et al.* (2002) pozorovali pokles exprese syntázy hyaluronové kyseliny 2 v kumulárních buňkách oocytektomovaných komplexů.

Dále bylo zjištěno, že přítomnost donoru sulfanu během meiotického zrání zvýšila úspěšnost aktivace oocytů po partenogenetické aktivaci (91,7 % vs. 75,8 %). Mechanismus, kterým donor sulfanu ovlivnil aktivační potenciál oocytů, zůstává neznámý. Jak bylo prokázáno, donor sulfanu ovlivňuje během meiotického zrání aktivitu MPF a MAPK, prostřednictvím kterých může ovlivnit také proces aktivace oocyty (Sanders *et Swann*, 2016).

4.2 Vliv sulfanu na průběh stárnutí prasečích oocytů

Bylo prokázáno, že sulfan je endogenně produkován během stárnutí prasečích oocytů. Endogenní produkce sulfanu klesla o 29 % po prvních 24 hodinách prodloužené kultivace. Zároveň docházelo během prodloužené kultivace ke snížení kvality oocytů. Po 48 hodinách stárnutí bylo v kontrolní skupině 37,2 % oocytů partenogeneticky aktivovaných a 18,3 % fragmentovaných. Po 72 hodinách stárnutí bylo 47,5 % oocytů partenogeneticky aktivovaných a 25,9 % fragmentovaných. Dále bylo zjištěno, že donor sulfanu zlepšuje kvalitu stárnoucích prasečích oocytů. Donor sulfanu zcela potlačil fragmentaci stárnoucích oocytů. Po 48 hodinách stárnutí se ve skupině ošetřené donorem sulfanu objevovaly pouze intaktní (76,7 %) a partenogeneticky aktivované oocyty (23,3 %). Po 72 hodinách stárnutí se ve skupině ošetřené donorem sulfanu objevovaly rovněž pouze intaktní (55 %) a partenogeneticky aktivované oocyty (45 %). Donor sulfanu působí antiapoptoticky v prasečích oocytech v koncentracích, které působí fyziologicky v jiných tkáních, například nervové soustavě (Else *et al.*, 2010). Lze předpokládat, že protektivní účinek donoru sulfanu je zprostředkován jeho schopností kompenzovat pokles endogenní produkce sulfanu

Dále bylo zjištěno, že inhibitory sulfan uvolňujících enzymů zhoršují kvalitu stárnoucích prasečích oocytů. Přítomnost inhibitorů sulfan uvolňujících enzymů během prodloužené kultivace oocytů způsobila výskyt partenogeneticky aktivovaných a fragmentovaných oocytů již po 24 hodinách stárnutí. Podíl partenogeneticky aktivovaných oocytů byl 13,3 % po ošetření KGA, 7,5 % po ošetření KA a 6,6 % po ošetření OA. Podíl fragmentovaných oocytů byl 12,5 % po ošetření KGA, 20 % po ošetření KA a 21,7 % po ošetření OA. Dále byl sledován vliv kombinací inhibitorů sulfan uvolňujících enzymů. Bylo zjištěno, že kombinace dvou inhibitorů způsobuje výraznější snížení kvality stárnoucích oocytů než jednotlivé inhibitory aplikované samostatně. Při současné aplikaci všech tří inhibitorů sulfan

uvolňujících enzymů došlo k nejvýraznějšímu zhoršení kvality stárnoucích oocytů. Obdobné účinky inhibice aktivity sulfan uvolňujících enzymů byly zaznamenány u somatických buněk. Ošetření srdeční tkáně potkana specifickými inhibitory CSE snížilo přežitelnost srdečních buněk po ischemii (Bian *et al.*, 2006). Inhibitor CSE způsobil rovněž rozsáhlejší poškození srdeční tkáně infarktem po uměle vyvolané ischemii a reperfuzi (Sivarajah *et al.*, 2006).

Dále bylo zjištěno, že donor sulfanu zlepšuje kvalitu stárnoucích prasečích oocytů ošetřených inhibitory sulfan uvolňujících enzymů. Donor sulfanu zcela potlačil fragmentaci stárnoucích oocytů ošetřených jednotlivými inhibitory sulfan uvolňujících enzymů po 24 hodinách prodloužené kultivace. Donor sulfanu také zcela potlačil fragmentaci oocytů ošetřených současně KA a OA a oocytů ošetřených současně KA a KGA po 72 hodinách prodloužené kultivace. Donor sulfanu potlačil částečně také fragmentaci oocytů ošetřených současně OA a KGA (z 24,2 % na 10 %) a oocytů ošetřených současně všemi třemi inhibitory sulfan uvolňujících enzymů (z 65,8 % na 20,5 %) po 72 hodinách prodloužené kultivace. Podobný efekt byl popsán u somatických buněk, inhibice endogenní produkce sulfanu vedla k apoptóze mezenchymálních kmenových buněk. I zde bylo prokázáno, že negativní vliv inhibice sulfan uvolňujících enzymů lze zvrátit dodáním exogenního donoru sulfanu. Donor sulfanu zlepšil jejich mitochondriální funkce a potlačil aktivitu kaspázy-3 (Li *et al.*, 2014a).

Dále bylo zjištěno, že donor sulfanu zlepšuje vývojový potenciál stárnoucích prasečích oocytů. Oocyty, které byly vystavené 24hodinové prodloužené kultivaci v médiu s donorem sulfanu, vykazovaly lepší časný embryonální vývoj než oocyty vystavené 24hodinové prodloužené kultivaci v médiu bez přídavku donoru sulfanu. Ve skupině oocytů stárnoucích v přítomnosti donoru sulfanu byl zaznamenán vyšší podíl rýhujících se embryí (54,2 % vs. 41,7 %) 48 hodin po partenogenetické aktivaci a vyšší podíl morul (20,8 % vs. 8,3 %) a blastocyst (15,8 % vs. 1,7 %) sedm dní po partenogenetické aktivaci.

4.3 Vliv česnekových derivátů na meiotické zrání prasečích oocytů a embryonální vývoj

Bylo zjištěno, že alliin narušuje průběh jaderného zrání prasečích oocytů. Přítomnost alliinu během meiotického zrání způsobila pokles podílu oocytů, které prodělaly GVBD po 20 hodinách kultivace, a pokles podílu oocytů, které prodělaly přechod z meiózy I do meiózy II po 30 hodinách kultivace. Dále bylo zjištěno, že S-allyl cystein nemá vliv na průběh jaderného zrání, aktivitu MPF a MAPK, ani produkci hyaluronové kyseliny během meiotického zrání. Alliin a z něj odvozené česnekové deriváty vykazují v organismu dvojí aktivitu, působí antiproliferativně a antioxidantně v závislosti na aplikované dávce a typu tkáně (Banerjee *et al.*, 2003; Izdebska *et al.*, 2016). Je tedy možné, že alliin působí na zrající oocyty

spíš cytostaticky. Naproti tomu vyžralý česnekový extrakt, jehož hlavní složkou je S-allyl cystein, vykazuje v organismu vyšší a stálejší protektivní účinky než česnekové deriváty odvozené od alliinu (Corzo-Martinez *et al.*, 2007).

Dále bylo zjištěno, že S-allyl cystein urychluje nástup rýhování embryí. Přítomnost S-allyl cysteinu během meiotického zrání oocytů zvýšila podíl rýhujících se embryí 22 hodin po partenogenetické aktivaci o 33,34 – 35 %. Časný nástup rýhování pozitivně koreluje s úspěšností následného embryonálního vývoje jak po IVF (Torner *et al.*, 2013), tak po partenogenetické aktivaci (Isom *et al.*, 2012) prasečích oocytů. Podobný efekt byl popsán u cysteinu, jehož je S-allyl cystein derivát. Cystein zvyšoval ve studii autorů Li *et al.* (2014b) podíl rýhujících se prasečích oocytů po ICSI.

Dále bylo zjištěno, že S-allyl cystein snižuje hladiny ROS ve zrajících a partenogeneticky aktivovaných oocytech. SAC snížil produkci ROS ve zrajících oocytech o 82,87 – 91,62 % po 24 hodinách kultivace a o 86,35 – 99,05 % po 48 hodinách kultivace. Také oocyty dozrálé v přítomnosti SAC a následně partenogeneticky aktivované a kultivované dalších 22 hodin v médiu bez přídavku SAC si udržely snížené hladiny ROS (o 57,8 – 66,33 %). Schopnost SAC snižovat intracelulární hladiny ROS byla prokázána v somatických buňkách (Tsai *et al.*, 2011). SAC je schopen zvyšovat aktivitu antioxidantních enzymů, jako jsou kataláza a glutation peroxidáza (Hsu *et al.*, 2004), a zvyšovat intracelulární hladiny glutationu, který je znám jako významný antioxidant zodpovědný za vylučování ROS v buňkách (Kohen *et Nyska*, 2002).

5 Závěry a doporučení

Cílem této práce bylo zjistit, zda lze zlepšit kvalitu prasečích oocytů v *in vitro* kultivačním systému přidáním donoru sulfanu a česnekových derivátů do kultivačního média.

Bylo zjištěno, že donor sulfanu urychluje jaderné zrání oocytů. Zrychlený průběh jaderného zrání byl doprovázen dřívějším vzestupem aktivity MPF a MAPK. Dále bylo zjištěno, že donor sulfanu potlačil produkci hyaluronové kyseliny v průběhu meiotického zrání, a že tato inhibice produkce hyaluronové kyseliny je zprostředkována oocytem. Donor sulfanu dále zvýšil úspěšnost partenogenetické aktivace oocytů dozrálých v jeho přítomnosti.

V dalších experimentech bylo zjištěno, že během stárnutí prasečích oocytů dochází k endogenní produkci sulfanu, a že tato endogenní produkce sulfanu klesá po prvních 24 hodinách prodloužené kultivace. Donor sulfanu zcela potlačil fragmentaci oocytů vystavených prodloužené kultivaci. Inhibitory sulfanu uvolňujících enzymů naopak zhoršily

kvalitu stárnoucích prasečích oocytů. Donor sulfanu zlepšil také kvalitu stárnoucích prasečích oocytů ošetřených inhibitory sulfan uvolňujících enzymů. Přítomnost donoru sulfanu během prodloužené kultivace oocytů zlepšuje jejich časný embryonální vývoj po partenogenetické aktivaci.

Dále bylo zjištěno, že zatímco alliin narušuje průběh jaderného zrání oocytů, S-allyl cystein nemá vliv na průběh jaderného zrání, aktivitu MPF a MAPK, ani produkci hyaluronové kyseliny během meiotického zrání oocytů. S-allyl cystein urychlil nástup rýhování embryí a snížil hladiny ROS ve zrajících a partenogeneticky aktivovaných oocytech.

Na základě výsledků těchto experimentů lze konstatovat, že kvalitu oocytů v *in vitro* kultivačním systému lze zlepšit dodáním donoru sulfanu a česnekového derivátu S-allyl cysteinu do kultivačního média.

6 Seznam použité literatury

- Abe, K., Kimura, H. 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *Journal of Neuroscience*. 16. 1066–1071.
- Agarwal, A., Saleh, R. A., Bedaiwy, M. A. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*. 79. 829–843.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing s.r.o. Ústí nad Labem. 630 s. ISBN: 80-902906-0-4.
- Amagase, H. 2006. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *Journal of Nutrition*. 136. 716S–725S.
- Badenas, J., Santalo, J., Calafell, J. M., Estop, A. M., Egozcue, J. 1989. Effect of the degree of maturation of mouse oocytes at fertilization: a source of chromosome imbalance. *Gamete Research*. 24 (2). 205–218.
- Banerjee, S. K., Mukherjee, P. K., Maulik, S. K. 2003. Garlic as an antioxidant: The good, the bad and the ugly. *Phytotherapy Research*. 17. 97–106.
- Bian, J. S., Yong, Q. C., Pan, T. T., Feng, Z. N., Ali, M. Y., Zhou, S., Moore, P.K. 2006. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 316 (2). 670–678.
- Boerjan, M. L., de Boer, P. 1990. First cell cycle of zygotes of the mouse derived from oocytes aged postovulation in vivo and fertilized in vivo. *Molecular Reproduction and Development*. 25 (2). 155–163.
- Chen, L., Wert, S. E., Hendrix, E. M., Russell, P. T., Cannon, M., Larsen, W. J. 1990. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of cumulus mass. *Molecular Reproduction Development*. 26. 236–247.
- Chhabria, S. V., Akbarsha, M. A., Li, A. P., Kharkar, P. S., Desai, K. B. 2015. In situ allicin generation using targeted alliinase delivery for inhibition of MIA PaCa-2 cells via epigenetic changes, oxidative stress and cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) expression. *Apoptosis*. 20 (10). 1388–409.
- Corzo-Martinez, M., Corzo, N., Villamiel, M. 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science and Technology*. 18. 609–625.
- Elsej, D. J., Fowkes, R. C., Baxter, G. F. 2010. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide. *Cell Biochemistry and Function*. 28 (2). 95–106.
- Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122. 829–838.
- Esfandiari, N., Falcone, T., Agarwal, A., Attaran, M., Nelson, D. R., Sharma, R. K. 2005. Protein supplementation and the incidence of apoptosis and oxidative stress in mouse embryos. *Obstetrics and Gynecology*. 105. 653–660.
- Fan, H. Y., Tong, C., Chen, D. Y., Sun, Q. Y. 2002. Roles of MAP kinase signaling pathway in oocyte meiosis. *Chinese Science Bulletin*. 47. 1157 – 1162.
- Fan, H. Y., Sun, Q. Y. 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*. 70. 535 – 547.
- Geng, Z., Lau, B. H. S. 1999. Aged garlic extract modulates glutathione redox cycle and superoxide dismutase activity in vascular endothelial cells. *Phytotherapy Research*. 11 (1). 54–56.
- George, M. A., Pickering, S. J., Braude, P. R., Johnson, M. H. 1996. The distribution of alpha- and gamma-tubulin in fresh and aged human and mouse oocytes exposed to cryoprotectant. *Molecular Human Reproduction*. 2 (6). 445–456.

- Gong, H., Chen, Z., Zhang, X., Li, Y., Zhang, J., Chen, Y., Ding, Y., Zhang, G., Yang, C., Zhu, Y., Zou, Y. 2015. Urotensin II Protects Cardiomyocytes from Apoptosis Induced by Oxidative Stress through the CSE/H2S Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*. 16 (6). 12482-98.
- Hampl, A., Eppig, J. J. 1995. Analysis of the mechanism(s) of metaphase-I arrest in maturing mouse oocytes. *Development*. 121. 925-933.
- Hashimoto, S., Minami, N., Yamada, M., Imai, H. 2000. Excessive concentration of glucose during in-vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in-vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Molecular Reproduction and Development*. 56. 520–526.
- Hsu, C. C., Huang, C. N., Hung, Y. C., Yin, M.C. 2004. Five cysteine-containing compounds have antioxidative activity in Balb/cA mice. *Journal of Nutrition*. 134 (1). 149–152.
- Hu, Y., Chen, X., Pan, T. T., Neo, K. L., Lee, S. W., Khin, E. S., Moore, P. K., Bian, J. S. 2008. Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. 455. 607–616.
- Huang, Y. T., Yao, C. H., Way, C. L., Lee, K. W., Tsai, C. Y., Ou, H. C., Kuo, W. W. 2013. Diallyl trisulfide and diallyl disulfide ameliorate cardiac dysfunction by suppressing apoptotic and enhancing survival pathways in experimental diabetic rats. *Journal of Applied Physiology*. 114 (3). 402-10.
- Izdebska, M., Grzanka, D., Gagat, M., Hałas-Wiśniewska, M., Grzanka, A. 2016. Downregulation of importin-9 protects MCF-7 cells against apoptosis induced by the combination of garlic-derived alliin and paclitaxel. *Oncology Reports*. 35 (5). 3084-93.
- Isom, S. C., Li, R. F., Whitworth, K. M., Prather, R. S. 2012. Timing of first embryonic cleavage is a positive indicator of the in vitro developmental potential of porcine embryos derived from in vitro fertilization, somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. *Molecular Reproduction and Development*. 79 (3). 197-207.
- Jiao, G. Z., Cao, X. Y., Cui, W., Lian, H. Y., Miao, Y. L., Wu, X. F., Han, D., Tan, J. H. 2013. Developmental Potential of Prepubertal Mouse Oocytes Is Compromised Due Mainly to Their Impaired Synthesis of Glutathione. 8(3). e58018.
- Kikuchi, K., Naito, K., Noguchi, J., Shimada, A., Kaneko, H., Yamashita, M., Aoki, F., Tojo, H., Toyoda, Y. 2000. Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 63 (3). 715–722.
- Kimura, N., Konno, Y., Miyoshi, K., Matsumoto, H., Sato, E. 2002. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biology of Reproduction*. 66. 707-717.
- Kohen, R., Nyska, A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 30 (6). 620–650.
- Kubelka, M., Motlík, J., Schultz, R. M., Pavlok, A. 2000. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, Without influencing chromosome condensation activity. *Biology of Reproduction*. 62 (2). 292-302.
- Lanman, J. T. 1968. Delays during reproduction and their effects on the embryo and fetus. 2. Aging of eggs. *The New England Journal of Medicine*. 278 (18). 993–999.
- Lanzotti, V. 2006. The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*. 1112 (1-2). 3-22.
- Lee, J., Miyano, T., Moor, R. M. 2000. Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote*. 8. 119 – 125.
- Li, C. S., Guo, Z., Guo, B. R., Xie, Y. J., Yang, J., Wang, A. 2014a. Inhibition of the endogenous CSE/H2S system contributes to hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Molecular Medicine Reports*. 9 (6). 2467–2472.

- Li, X. X., Lee, K. B., Lee, J. H., Kim, K. J., Kim, E. Y., Han, K. W., Park, K. S., Yu, J., Kim, M.K. 2014b. Glutathione and cysteine enhance porcine preimplantation embryo development in vitro after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 81 (2). 309–314.
- Liang, R., Yu, W., Du, J., Yang, L., Shang, M., Guo, J. 2006. Localization of cystathionine β synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. *Chinese Medical Journal*. 119. 1877–1883.
- Liang, C. G., Su, Y. Q., Fan, H. Y., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2007 Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of Mitogen-activated Protein Kinase. *Molecular Endocrinology*. 21. 2037 – 2055.
- Longo, F. J. 1981. Changes in the zones pellucidae and plasmalemma of aging mouse eggs. *Biology of Reproduction*. 25 (2). 399–411.
- Lord, T., Aitken, R. J. 2013. Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction*. 146 (6). 217–227.
- Louis, X. L., Murphy, R., Thandapilly, S. J., Yu, L., Netticadan, T. 2012. Garlic extracts prevent oxidative stress, hypertrophy and apoptosis in cardiomyocytes: a role for nitric oxide and hydrogen sulfide. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12. 140.
- Mailhes, J. B., Young, D., London, S. N. 1998. Postovulatory ageing of mouse oocytes in vivo and premature centromere separation and aneuploidy. *Biology of Reproduction*. 58 (5). 1206–1210.
- Markides, C. S., Roy, D., Liehr, J. G. 1998. Concentration dependence of prooxidant and antioxidant properties of catecholestrogens. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 360. 105–112.
- Miao, Y., Ma, S., Liu, X., Miao, D., Chang, Z., Luo, M., Tan, J. 2004. Fate of the first polar bodies in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 69 (1). 66–76.
- Miething, H. 1988. HPLC - analysis of the volatile oil of garlic bulbs. *Phytother Research*. 2. 149–51.
- Motlik, J., Fulka, J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. 25. 87-96.
- Mustafa, A. K., Gadalla, M. M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S. K., Barrow, R. K., Yang, G., Wang, R., Snyder, S. H. 2009. H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Science Signaling*. 2 (96). ra72.
- Nagyova, E., Vanderhyden, B., Prochazka, R. 2000. Secretion of paracrine factors enabling expansion of cumulus cells is developmentally regulated in pig oocytes. *Biology of Reproduction*. 63. 1149–1156.
- Nakayama, T., Inoue, M., Sato, E. 1996. Effect of oocyectomy on glycosaminoglycan composition during cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro. *Biology of Reproduction*. 55. 1299-1304.
- Nebreda, A. R., Gannon, J. V., Hunt, T. 1995. Newly synthesized protein(s) must associate with p34(CDC2) to activate MAP kinase and MPF during progesterone-induced maturation of Xenopus oocytes. *Embo Journal*. 14. 5597-5607.
- Ning, N., Zhu, J., Du, Y., Gao, X., Liu, C., Li, J. 2014. Dysregulation of hydrogen sulphide metabolism impairs oviductal transport of embryos. *Nature Communications*. 5: 4107.
- Njie-Mbye, Y. F., Kulkarni, M., Opere, C. A., Ohia, S. E. 2012. Mechanism of action of hydrogen sulfide on cyclic AMP formation in rat retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research*. 98. 16–22.
- Qian, Q., Shi, W. Q., Ding, J. T., Sha, J. H., Fan, B. Q. 2003. Predictive value of the area of expanded cumulus mass on development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal of Reproduction and Development*. 49. 167-174.

- Sanders, J. R., Swann, K. 2016. Molecular triggers of egg activation at fertilization in mammals. *Reproduction*. 152 (2). R41-50.
- Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., Kimura, H. 2009. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants and Redox Signaling*. 11. 703–714.
- Sivarajah, A., McDonald, M. C., Thiemermann, C. 2006. The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat. *Shock*. 26 (2). 154-161.
- Srilatha, B., Adaikan, P. G., Li, L., Moore, P. K. 2007. Hydrogen sulfide: a novel endogenous gasotransmitter facilitates erectile function. *Journal of Sexual Medicine*. 4. 1304–1311.
- Srilatha, B., Hu, L., Adaikan, G. P., Moore, P. K. 2009. Initial characterization of hydrogen sulfide effects in female sexual function. *Journal of Sexual Medicine*. 6. 1875–1884.
- Sun, Q., Huang, J., Yue, Y. J., Xu, J. B., Jiang, P., Yang, D. L., Zeng, Y., Zhou, W. L. 2016. Hydrogen Sulfide Facilitates Vaginal Lubrication by Activation of Epithelial ATP-Sensitive K(+) Channels and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *The Journal of Sexual Medicine*. 13 (5). 798-807.
- Szollosi, D. 1971. Morphological changes in mouse eggs due to aging in the fallopian tube. *American Journal of Anatomy*. 130 (2). 209–225.
- Takahashi, T., Takahashi, E., Igarashi, H., Tezuka, N., Kurachi, H. 2003. Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 66 (2). 143–152.
- Takenaka, M., Horiuchi, T., Yanagimachi, R. 2007. Effects of light on development of mammalian zygotes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 104. 14289–14293.
- Torner, E., Bussalleu, E., Briz, M. D., Yeste, M., Bonet, S. 2013. Energy substrate influences the effect of the timing of the first embryonic cleavage on the development of in vitro-produced porcine embryos in a sex-related manner. *Molecular Reproduction and Development*. 80 (11). 924-35.
- Tsai, S. J., Chiu, C. P., Yang, H. T., Yin, M. C. 2011. s-Allyl cysteine, s-ethyl cysteine, and s-propyl cysteine alleviate b-amyloid, glycative, and oxidative injury in brain of mice treated by D-galactose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (11). 6319–6326
- Wang, R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *Faseb Journal*. 16. 1792-1798.
- Wang, K., Ahmad, S., Cai, M., Rennie, J., Fujisawa, T., Crispi, F., Baily, J., Miller, M. R., Cudmore, M., Hadoke, P. W., Wang, R., Gratacos, E., Buhimschi, I. A., Buhimschi, C. S., Ahmed, A. 2013. Dysregulation of hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine γ -lyase contributes to maternal hypertension and placental abnormalities in preeclampsia. *Circulation*. 127 (25). 2514-22.
- Wassarman, P. M. 1988. The Mammalian Ovum. In: Knobil, E., Neil, J. (eds.). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York. 69-102. ISBN: 0781700868.
- Whiteman, M., Armstrong, J. S., Chu, S. H., Jia-Ling, S., Wong, B. S., Cheung, N. S., Halliwell, B., Moore, P. K. 2004. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? *Journal of Neurochemistry*. 90 (3). 765-8.
- Yanagimachi, R. 1988. Mammalian fertilization. 135-185. In: Knobil, E., Neil, J. et al. (eds.) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York. 2413 s.
- Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., Wang, R. 2001. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener, *The EMBO Journal*. 20. 6008–6016.

7 Seznam publikací autora k řešené problematice

Dvořáková, M., Weingartová, I., Nevoral, J., Němeček, D., Krejčová, T. 2015. Garlic sulfur compounds suppress cancerogenesis and oxidative stress: A review. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 46 (2). 65-72.

Dvořáková, M., Heroutová, I., Němeček, D., Zámostná, K., Krejčová, T., Nevoral, J., Kučerová-Chrpová, V., Petr, J., Sedmíková, M. 2016. The antioxidative properties of S-allyl cysteine not only influence somatic cells but also improve early embryo cleavage in pigs. *PeerJ*. 4: e2280.

Krejčová, T., Šmelcová Krejčová, M., Petr, J., Bodart, J.-F., Sedmíková, M., Nevoral, J., Dvořáková, M., Vyskočilová, A., Weingartová, I., Kučerová Chrpová, V., Chmelíková, E., Tůmová, L., Jílek, F. 2015. Hydrogen Sulfide Donor Protects Porcine Oocytes against Aging and Improves the Developmental Potential of Aged Porcine Oocytes. *PLoS One*. 10 (1). 1-17.

Nevoral, J., Petr, J., Gelaude, A., Bodart, J.-F., Kučerová Chrpová, V., Sedmíková, M., Krejčová, T., Kolbabová, T., Dvořáková, M., Vyskočilová, A., Weingartová, I., Křivohlávková, L., Žalmanová, T., Jílek, F. 2014. Dual Effects of Hydrogen Sulfide Donor on Meiosis and Cumulus Expansion of Porcine Cumulus-Oocyte Complexes. *PLoS One*. 9 (7). 1-9.