

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



**Možnosti ovlivnění kvality prasečích oocytů vybranými
suplementy kultivačního média**
doktorská disertační práce

Autor: **Ing. David Němeček**

Školitel: **prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková, Ph.D.**

Praha 2018

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem doktorskou disertační práci na téma „Možnosti ovlivnění kvality prasečích oocytů vybranými suplementy kultivačního média“ vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze dne: 18. 4. 2018

podpis autora

Poděkování

Rád bych tímto poděkoval své školitelce prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D., která mi významně pomohla při plánování a řešení experimentů, vyhodnocení získaných výsledků a zároveň při tvorbě vědeckých publikací. Současně bych rád poděkoval kolektivu doktorandů a zaměstnanců za vytvoření přátelské atmosféry během mého doktorského studia.

Seznam zkratk

AGE	aged garlic extract	vyzrálý česnekový extrakt
APC/C	anaphase promoting complex/cyclosome	anafázi podporující komplex/cyklosom
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
CaMKII	Ca/calmodulin dependent protein kinase II	Ca/kalmodulin dependentní protein
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	cyklický adenosinmonofosfát
CDC20	cell-division cycle protein 20	protein cell-division cycle 20
CDC25	cell division cycle protein 25	protein cell division cycle 25
CDK1	cyklin dependentní kinázy 1	cyclin dependent kinase 1
CL	corpus luteum	žluté tělísko
CO	carbon monoxide	oxid uhelnatý
CrMP	chromium mesoporphyrin IX	mesoporfyrin chromu IX
CSF	cytostatic factor	cytostatický faktor
cGMP	cyclic guanosine monophosphate	cyklický guanosinmonofosfát
DADS	diallyl disulfide	diallyl disulfid
DAS	diallyl sulfide	diallyl sulfid
DATS	diallyl trisulfide	diallyl trisulfid
EGF	epidermal growth factor	epidermální růstový faktor
FF	follicular fluid	folikulární tekutina
FSH	follicle stimulating hormone	folikulu stimulační hormon
GSH	glutathione	glutathion
GV	germinal vesicle	zárodečný váček
GVBD	germinal vesicle breakdown	rozpad zárodečného váčku
HO	heme oxygenase	hem oxygenáza
H ₂ S	hydrogen sulfide	sulfan
IVM	<i>in vitro</i> maturation	<i>in vitro</i> zrání
JNK	c-jun kinase	c-jun kináza
LH	luteinizing hormone	luteinizační hormon
MAPK	mitogen-activated protein kinase	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MPF	maturation promoting factor	maturaci podporující faktor

NADH	nicotinamide adenine dinucleotide	nikotinamidadeninukleotid
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NO	nitric oxide	oxid dusnatý
NOS	nitric oxide synthase	syntáza oxidu dusnatého
Nrf2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	jaderný faktor odvozený od erytrocytů 2
NPPC	natriuretic peptide precursor C	prekurzor natriuretického peptidu C
NPR2	natriuretic peptide receptor 2	receptor natriuretického peptidu 2
PDE3A	phosphodiesterase 3A	fosfodiesteráza 3A
PGC	primordial germ cell	priodiální zárodečné buňky
PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase	fosfainositol 3 kináza
PKA	protein kinase A	protein kináza A
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10	
SAC	s-allyl cysteine	s-allyl cystein
ROS	reactive oxygen species	volné kyslíkové radikály
TGF	transforming growth factor	transformující růstový faktor
ZnPP	zinc protoporphyrin IX	protoporfyrin zinku IX

Obsah

1 Úvod	12
2 Literární rešerše.....	14
2.1 Oogeneze a folikulogeneze.....	14
2.1.1 Vznik pohlavních buněk.....	14
2.1.2 Růst oocytů a folikulogeneze.....	15
2.1.3 Meiotické zrání	19
2.2 Stárnutí oocytů.....	25
2.3.1 Oxid uhelnatý	27
2.3.2 Signální dráha HO/CO.....	28
2.3.3 Buněčné cíle CO.....	30
2.3.4 HO/CO v samičí reprodukční soustavě.....	32
2.3.5 HO/CO v období březosti.....	35
2.4. Význam česnekových derivátů v organismu	37
2.5 Ovlivnění <i>in vitro</i> zrání oocytů.....	39
3 Hypotézy a cíle.....	42
4 Materiál a metody.....	43
4.1 Získání materiálu a kultivace oocytů v <i>in vitro</i> podmínkách	43
4.2 Vliv suplementace kultivačního média donorem CO, inhibitorem HO nebo S-allyl cysteinem (SAC)	43
4.3 Real-time polymerázová řetězová reakce	44
4.4 Western blot.....	45
4.5 Imunocytochemie.....	45
4.6 Hodnocení stádia meiotického zrání oocytů.....	46
4.7 Hodnocení <i>in vitro</i> stárnutí oocytů.....	46
4.8 Kinázová aktivita.....	46
4.9 Intenzita kumulární expanze	47
4.10 Vyhodnocení produkce reaktivních forem kyslíku	47
4.11 Hodnocení vývojové kompetence	48
4.12 Statistické hodnocení	48
5 Publikované práce	49
5.1 Anti-apoptotický efekt oxidu uhelnatého během <i>in vitro</i> stárnutí prasečích oocytů	49
5.2 Vliv suplementace kultivačního média donorem CO na meiotické zrání prasečích oocytů....	52
5.3 Význam signální dráhy hemoxygenáza/oxid uhelnatý v samičí reprodukční soustavě.....	55

5.4 Antioxidační vlastnosti S-allyl cysteinu během meiotického zrání prasečích oocytů a časného embryonálního vývoje.....	56
5.5 Vliv česnekových sloučenin na buněčné funkce.....	58
6 Závěr	59
8 Seznam použité literatury	61
9 Přílohy.....	92

Abstrakt

Úspěšnost metod reprodukčních biotechnologií a asistované reprodukce je závislá na kvalitě oocytů. Používané *in vitro* metody jsou charakteristické zvýšeným působením stresorů, které se následně projeví na snížené kvalitě oocytů. V tuto chvíli je nereálné plné napodobení *in vivo* podmínek v *in vitro* a z toho důvodu je snaha využití jiných možností za účelem udržení kvality oocytů. Perspektivní metodou je suplementace kultivačního média. Vzhledem ke skutečnosti, že důležitým negativním faktorem v *in vitro* podmínkách je zvýšený oxidativní stres, může suplementace kultivačního média látkami s antioxidační aktivitou zvýšit kvalitu oocytů. Pozitivní efekt na kvalitu oocytů může mít rovněž modulace signálních drah, přičemž perspektivními molekulami jsou gasotransmitery. Na somatických buňkách a částečně i na oocytech je totiž prokázáno, že gasotransmitery mohou působit antiapoptoticky a podílí se na zvýšení životaschopnosti buněk. Z těchto důvodů jsme se zaměřili na vliv suplementace kultivačního média S-allyl cysteinem (SAC) a donorem oxidu uhelnatého (CO), jakožto látek s antioxidačními a antiapoptotickými vlastnostmi, na kvalitu meioticky zrajících a stárnoucích prasečích oocytů.

Efekt suplementace kultivačního média donorem CO na stárnoucí prasečí oocyty jsme sledovali na základě posouzení morfologických znaků stárnutí a aktivity kaspazy-3 (marker zahájení apoptotického rozpadu). Zjistili jsme, že kultivace stárnoucích oocytů v kultivačním médiu obsahujícím donor CO vede ke snížení podílu apoptotických oocytů a současně ke zvýšení podílu intaktních oocytů. Zároveň donor CO výrazně snížil míru aktivace kaspázy-3. Na základě získaných dat předpokládáme, že suplementace kultivačního média donorem CO může zpomalit proces stárnutí prasečích oocytů a zvýšit jejich životaschopnost.

Současně jsme sledovali vliv suplementace kultivačního média donorem CO na průběh meiotického zrání. Kultivace meioticky zrajících oocytů v přítomnosti CO vedla k zastavení meiotického zrání ve stádiu metafáze I. Na druhou stranu donor CO snížil množství reaktivních forem kyslíku (ROS) v oocytech. Na základě dosud získaných výsledků předpokládáme, že donor CO může v meioticky zrajících oocytech snížit oxidativní stres, ale současně inhibuje samotný průběh meiotického zrání.

SAC je česnekovou sloučeninou, která má výrazné antioxidační vlastnosti a současně má schopnost uvolňovat gasotransmitter sulfan a aktivovat cytoprotektivní

enzym hemoxygenáza, zodpovědný za endogenní produkci CO. Efekt suplementace kultivačního média SAC u meioticky zrajících oocytů vedl k výraznému snížení produkce ROS. Současně SAC zlepšil časný embryonální vývoj, neboť zvýšil míru rýhování embryí vzniklých po partenogenetické aktivaci. Zároveň předpokládáme, že meiotické zrání v přítomnosti SAC zvýšilo antioxidační potenciál embryí, protože embrya vzniklá po partenogenetické aktivaci vykazovala sníženou produkci ROS. Z těchto důvodů považujeme SAC jako perspektivní suplement kultivačního média, který zlepšuje vývojový potenciál a působí antioxidantivně.

Na základě získaných výsledků lze CO a SAC, považovat jako látky schopné zvýšit nebo udržet kvalitu prasečích oocytů.

Abstract

The success of reproductive biotechnology and assisted reproduction methods depends on the quality of oocytes. The used in vitro methods are characterized by an increased rate of stress, which subsequently results in decreased oocyte quality. At this time, it is unrealistic to fully mimic in vivo conditions to in vitro, and therefore is the effort to explore other options in order to maintain the oocytes quality. A prospective method is the culture medium supplementation. Due to the fact that increased oxidative stress is an important negative factor in in vitro conditions, supplementation of the culture medium with substances with antioxidant activity may enhance oocytes quality. Modulation of signaling pathways may also have a positive effect on oocytes quality, while promising molecules are gasotransmitters. On somatic cells and partly on oocytes, it has been shown that gasotransmitters may have an antiapoptotic effect and contributes to the increase in cell viability. For these reasons, we have focused on the effect of S-allyl cysteine (SAC) and carbon monoxide (CO) donor as substances with antioxidant and antiapoptotic properties on the quality of meiotically maturing and aging porcine oocytes.

The effects of CO donor on porcine oocytes aging was assessed based on the morphological characteristics and caspase-3 activity (apoptotic marker). We have found that cultivation of aging oocytes in culture medium containing CO donor leads to a reduction in the proportion of apoptotic oocytes and to an increase in the proportion of intact oocytes. At the same time, the CO donor significantly reduced the caspase-3 activation. On the basis of the obtained data, we suppose that the supplementation of the culture medium with the CO donor may slow the aging of porcine oocytes and increase their viability.

We also evaluated the effect of the CO donor on the meiotic maturation of the porcine oocytes. Oocyte meiotic maturation in the presence of CO led to the meiotic maturation arrest in the metaphase I stage. On the other hand, the CO donor reduced the amount of reactive oxygen species (ROS) in oocytes. Based on the results obtained so far, we assume that the CO donor may reduce oxidative stress in meiotically matured oocytes, but it also inhibits the meiotic maturation process.

SAC is a garlic compound that has pronounced antioxidant properties and has the ability to release the gasotransmitter sulfane and activate the cytoprotective

enzyme hemoxygenase, which is responsible for endogenous CO production. The effect of SAC supplementation of the culture medium on meiotic maturation resulted in a significant reduction in ROS production. Simultaneously SAC improved early embryonic development, because it increased the cleavage rate of parthenogenetic activated oocytes. At the same time, meiotic maturation in the presence of SAC increased the antioxidant potential, because embryos resulting from parthenogenetic activation showed reduced ROS production. For these reasons we consider SAC as the perspective culture medium supplement which improve the developmental potential and reduce oxidative stress.

Based on the obtained results we can consider CO and SAC as a substances capable of increasing or maintaining the quality of porcine oocytes

1 Úvod

Reprodukční biotechnologie, jako např. *in vitro* oplození, jsou důležitým oborem v humánní a veterinární medicíně. Častou komplikací je však omezená kvalita použitých oocytů a s tím i související nízký počet vhodného materiálu. Jedním z faktorů zodpovědných za sníženou kvalitu oocytů je zvýšené působení stresových faktorů v *in vitro* podmínkách v porovnání s *in vivo* podmínkami. Přestože je snaha omezit působení stresových faktorů a tím kultivační podmínky optimalizovat, je kvalita oocytů a následný vývojový potenciál horší u oocytů pocházejících z *in vitro* podmínek. V *in vivo* podmínkách na oocyt působí komplexní prostředí, které se navíc v průběhu času mění. Současně v tuto chvíli ani neznáme všechny faktory, které na oocyty v *in vivo* podmínkách působí. Z těchto důvodů je prozatím nereálné plné napodobení *in vivo* podmínek v *in vitro*. Na druhou stranu je ukázáno, že lze kvalitu oocytů ovlivnit suplementací kultivačního média specifickými látkami. Tyto látky např. mohou snížit oxidativní zátěž oocytů a zvýšit jejich životaschopnost.

Klíčovým dějem předcházejícím vzniku oplození schopného oocytu je meiotické zrání. To zahrnuje děje odehrávající se v oocytu při přechodu z prvního meiotického bloku do druhého meiotického bloku. V průběhu meiotického zrání dochází k reorganizaci organel, cytoskeletu a zejména k rozdělení dědičné informace. V případě, že meiotické zrání neproběhne správným způsobem, dochází ke snížení oplození schopnosti a vývojové kompetence, přičemž v *in vitro* podmínkách bývá právě vývojová kompetence výrazně narušena. Oocyt nacházející se v druhém meiotickém bloku je připravený na oplození spermií, která oocyt případně aktivuje a tím zahájí embryonální vývoj. Pokud však nedojde k oplození ve specifickou a relativně krátkou dobu po dozrání oocytu do druhého meiotického bloku, dochází k postupnému snižování kvality oocytu označované jako stárnutí. V konečném důsledku vede stárnutí k partenogenetické aktivaci nebo apoptotickému či lytickému rozpadu. Podobně jako při narušení meiotického zrání se i při stárnutí snižuje kvalita oocytů, oplození schopnost a vývojový potenciál. Pokud tedy zabráníme negativním projevům stárnutí, můžeme získat jednak větší množství a zároveň i lepší kvalitu získaných oocytů.

Meiotické zrání a stárnutí oocytů je regulováno řadou faktorů, přičemž důležitou roli zaujímají gasotransmitery, což jsou signální plynné molekuly. Do gasotransmiterů

se řadí oxid dusnatý, sulfan a oxid uhelnatý (CO). Vliv CO na meiotické zrání a stárnutí oocytů prozatím nebyl zkoumán a vzhledem ke skutečnosti, že v somatických buňkách zvyšuje jejich životaschopnost, zaměřili jsme se na CO jako na potenciální suplement kultivačního média. CO je v organismu produkován enzymem hemoxygenáza (HO) a HO/CO představuje signální dráhu, která je v buňkách aktivována při působení stresorů (např. zvýšený oxidativní stres) a efektem dráhy HO/CO je obrana buněk proti těmto stresorům. *In vitro* kultivace oocytů je zatížena právě zvýšeným působením stresorů a z toho důvodu by ovlivnění dráhy HO/CO mohlo udržet nebo zvýšit kvalitu kultivovaných oocytů.

Dalším potenciálním supplemtem kultivačního média je S-allyl cystein (SAC), který představuje česnekovou sloučeninu vzniklou zpracováním česnekových palic. Při sledování efektu SAC na somatické buňky je prokázáno, že působí protektivně a snižuje míru apoptózy. Jedním z důležitých mechanismů efektu SAC je potlačení působení oxidativního stresu a právě zvýšení oxidativní stres je častým jevem *in vitro* kultivace oocytů. Mimo potlačení oxidativního stresu může SAC sloužit jako zdroj sulfanu, důležitého gasotransmiteru, u kterého je již známo, že je zapojen do regulace meiotického zrání oocytů a životaschopnosti stárnoucích oocytů. Zároveň může SAC působit prostřednictvím aktivace HO a tím zvýšením tvorby CO. Z těchto důvodů jsme se zaměřili na SAC jako na další potenciální suplement kultivačního média prasečích oocytů.

2 Literární rešerše

2.1 Oogeneze a folikulogeneze

2.1.1 Vznik pohlavních buněk

Pohlavní buňky se vyvíjí z primordiálních zárodečných buněk (PGCs), které vznikají v těle embrya brzy v průběhu embryonálního vývoje (Wassarman, 1988). PGCs se zakládají ve žloutkovém vaku, odkud migrují přes zadní prvostřevo do základu gonád (Tam & Snow, 1981; Donovan et al., 1986). U prasete se PGCs objevují okolo 24. dne embryonálního vývoje (Black & Erickson, 1968). Klíčovým znakem PGCs je schopnost aktivně se pohybovat a zároveň reagovat na chemotaktické látky (např. TGF - β 1, kit signalizace a působení aktivinu), které určují směr, jakým se mají pohybovat (Wylie, 1993; Picton et al., 1998; Richardson & Lehmann, 2010). V průběhu migrace PGCs vykazují výraznou mitotickou aktivitu a dochází k nárůstu jejich počtu (Wassarman & Albertini, 1994). Genetické založení jedince určí, zda se PGCs diferencují do samčí nebo samičí linie. U samičího pohlaví podstoupí PGCs, jež kolonizovali základ gonád, diferenciaci za vzniku oogonií. Oogonie jsou charakteristické vysokou mírou proliferace s neúplnou cytokinezí (Picton et al., 1998). Tímto způsobem vznikají skupiny buněk (označované jako germ-cell nests nebo germ-cell cysts), které jsou spolu propojeny pomocí cytoplazmatických můstků. Vzájemné propojení umožňuje přenos molekul a organel mezi buňkami (Pepling, 2006). Během vývoje se germ-cell nests prostřednictvím programované buněčné smrti rozpadají, a tak se uvolňují jednotlivé oocyty (Buszczak & Cooley, 2000; Pepling & Spradling, 2001; Greenfeld et al., 2007).

Schopnost oogonií proliferace je zastavena ještě před tvorbou folikulů a v reakci na působení retinové kyseliny a proteinu STRA8 (stimulated by retinoic acid gene 8 protein homolog) zahájí meiotické dělení. Retinová kyselina u oogonií aktivuje tvorbu STRA8, což je cytoplazmatický protein důležitý pro poslední kolo replikace DNA před vstupem do profáze prvního meiotického dělení (Bowles et al., 2006; Zhou et al., 2008; Sánchez & Smitz, 2012). Prasečí oogonie zahajují meiotické dělení zhruba 47. den embryonálního vývoje (Black & Erickson, 1968). Po vstupu do meiotického dělení jsou tyto buňky již označovány jako primární oocyty (Alberts et al., 2007).

Na základě Zuckermanovi (1951) teorie se předpokládalo, že počet prenatalně vytvořených oocytů je konečný a nadále dochází v průběhu života jedince pouze ke

snižování jejich počtu, tj. že v dospělosti nejsou funkční kmenové buňky, které populaci oocytů obnovují. Platnost této teorie je však sporná, neboť minimálně u některých živočišných druhů byla prokázána postnatální obnova oocytů (Johnson et al, 2004; Wang et al., 2017).

Po zahájení meiotického dělení oocyt vstupuje do profáze prvního meiotického dělení, která je nejdelší fází meiozy a skládá se z 5 částí - leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze. Nejdříve dochází k spiralizaci a kondenzaci chromozomů, přičemž každý chromozom je složený ze dvou chromatid, které vzájemně spojuje komplex kohesinů. Poté dochází k párování homologních chromozomů za vzniku tzv. bivalentů. Procesem crossing-over se v homologních chromozomech v bivalentech vyměňují úseky DNA. Crossing over zajišťuje vznik variability budoucího potomstva a je charakteristickým znakem meiotického dělení. Ve fázi diplotene se chromozomy začínají rozdělovat, ale stále jsou společně propojeny v místech výměny DNA (tzv. chiazmatech). V této fázi dochází v oocytech k zastavení meiotického dělení v prvním meiotickém bloku a k opětovnému zahájení dojde až v reakci na dostatečnou endokrinní stimulaci v době pohlavní dospělosti (Wassarman & Albertini, 1994; Hurk & Zhao, 2004; Hunt & Hassold, 2008; Cohen & Holloway, 2015). Oocyt nacházející se v prvním meiotickém bloku má dekonzenzovaný chromatin a jádro je označováno jako zárodečný váček (GV) (Wassarmann, 1988; Wassarman & Albertini, 1994).

2.1.2 Růst oocytů a folikulogeneze

Primární oocyt, který vstoupil do prvního meiotického bloku, není schopný podstoupit meiotické zrání a stát se oplození schopným oocytem. Schopnost meioticky dozrát oocyt dosáhne až po období růstu, kdy probíhá výrazná syntéza a příjem molekul, které jsou z velké části v oocyту skladovány. Období růstu lze u savců dělit do dvou částí. V první části roste vlastní oocyt a v druhé je již velikost oocytu neměná a roste pouze folikulární obal. U pohlavně dospělých zvířat oocyt dosáhne plné velikosti před vznikem antrální dutiny folikulu. Pro dosažení meiotické kompetence musí oocyt prasnice zvětšit svůj průměr z původních 30 μm na 120 μm (Wassarman & Albertini, 1994; Picton et al., 1998; Hunter, 2000; Bielanska-Osuchowska, 2006).

V období růstu se vytváří *zona pellucida* (ZP), která je tvořena specifickými glykoproteiny. ZP zaujímá důležitou funkci při fertilizaci, kdy zabraňuje mezidruhovému

oplození a po modifikaci vytváří blok proti polyspermii. ZP se vytváří na povrchu oocytu a odděluje ho od folikulárních buněk. Komunikace mezi oocytem a folikulárními buňkami je zachována prostřednictvím mikrokulků oocytu, které prochází přes vrstvu ZP a vytváří spojení s folikulárními buňkami prostřednictvím gap junctions. Tyto spoje se skládají z proteinů connexinů, které umožňují průchod malých molekul do 1 kDa (Wassarman & Albertini; 1994, Soyal et al., 2000; Li et al., 2007), jako jsou např. inhibiční nebo stimulační meiotické signály (Picton et al., 1998).

Pro vývoj oocytu a v případě oplození také embrya je důležité, aby rostoucí oocyt vytvořil dostatečnou zásobu RNA. U plně dorostlé, meioticky kompetentního oocytu je transkripce zastavena a k jejímu obnovení dojde až v druhově specifické době reaktivace embryonálního genomu. Z toho důvodu je pro růst charakteristická výrazná syntéza RNA. Životnost jednotlivých transkriptů je regulována prostřednictvím polyadenylace (prodlužování poly – A konce mRNA) a deadenylace (zkrácení poly – A konce mRNA). Transkripty jsou skladovány v cytoplazmě oocytů v ribonukleových proteinech (ribonucleoproteins, RNP), kde se spojují s maskovacími faktory zabraňujícími nasednutí ribozomů (Wassarman & Albertini, 1994; Picton et al., 1998; Eichenlaub-Ritter & Peschke, 2002).

Kromě syntézy látek dochází během růstu k přestavbě organel a změnám v jejich lokalizaci. Kupříkladu cisterny Golgiho komplexu se přesouvají do blízkosti cytoplazmatické membrány, kde vytváří glykoproteiny ZP a kortikální granula (Mehlmann et al., 1995; Hurk & Zhao, 2004). Rovněž lokalizace mitochondrií převládá v korové oblasti oocytů a současně dochází k výrazné tvorbě nových mitochondrií a změnám v tvaru krist (Wassarman & Albertini, 1994; Picton et al., 1998).

Brzy během oogeneze dochází ke vzniku folikulů. Na oocyty nacházející se v prvním meiotickém bloku nasedají buňky pocházející ze somatických buněk vaječníku a mesonefros. Tímto způsobem vznikají tzv. primordiální folikuly, které jsou charakteristické jednovrstevným obalem plochých buněk. Oocyty, u kterých nedošlo ke vzniku folikulárního obalu, podléhají apoptotickému rozpadu (Soyal et al., 2000; Pepling & Spradling, 2001; Sawyer et al., 2002). Primordiální folikuly tvoří klidové stádium, ve kterém se jednak nesyntetizují steroidní hormony a ani neexprimují receptory pro folikulostimulační hormon (FSH). V tomto stádiu zůstanou až do doby,

kdy jsou aktivovány a rekrutovány (recruitment) do kohorty rostoucích folikulů (Hirshfield, 1991; Picton et al., 1998).

Obecně se recruitment dělí na tzv. initial recruitment a cyclic recruitment. Initial recruitment označuje základní aktivaci primordiálních folikulů opakující se během života. Z těchto aktivovaných folikulů je následně procesem cyclic recruitment vybráno několik folikulů, které rostou až do preovulační velikosti (McGee & Hsueh, 2000). Míra recruitmentu primordiálních folikulů je regulována signální dráhou PTEN a PI3K (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 a phosphatidylinositol 3 kinase), kdy PI3K působí aktivačně a PTEN inhibičně na aktivaci. Poruchy v signálních drahách PTEN a PI3K mají výrazný vliv na reprodukční schopnosti, kdy např. neaktivní PTEN vede k předčasné aktivaci populace primordiálních folikulů a následnému selhání reprodukce (Lee et al., 2001; Reddy et al., 2005; Adhikari & Liu, 2009; Sánchez & Smits, 2012).

U aktivovaných folikulů dochází k proliferaci a růstu folikulárního obalu, přičemž první stádia folikulogeneze jsou nezávislá na působení FSH. Z primordiálních folikulů vznikají primární folikuly, které mají stále jednu vrstvu granulozních buněk, ale tyto buňky již mají kubický tvar. Dále ve vývoji folikulů dochází k proliferaci folikulárních buněk a okolo oocyty vzniká více vrstev granulozních buněk. Tento folikul se nazývá sekundárním. Ve stádiu sekundárního folikulu vstupuje oocyt do růstové fáze, vytváří ZP a z intersticiálních buněk ovariálního stromatu vznikají buňky théky tvořící vrstvu *theca folliculi* (Hirshfield, 1991; Meduri et al., 2002; Hurk & Zhao, 2004). V *theca folliculi* sekundárních oocytů se vytváří receptory pro luteinizační hormon (LH) přes které LH aktivuje syntézu androgenů. Androgeny stimulují tvorbu FSH receptorů v granulozních buňkách. Sekundární folikul je tedy stádiem, kdy se folikul stává citlivým na gonadotropní hormony, není však ještě vybaven enzymem aromatázou potřebnou pro přeměnu androgenů na estrogeny a kvůli tomu estrogeny nesyntetizuje (Hirao et al., 1994; Fair, 2003; Hurk & Zhao, 2004).

Během dalšího vývoje folikulu vzniká tekutinou vyplněná dutina (antrum), která je charakteristickým znakem terciálního (antrálního) folikulu. Vývoj terciálního folikulu je již plně závislý na působení gonadotropních hormonů. V tomto stádiu dochází k diferenciaci *theca folliculi* na vnitřní *theca folliculi interna* a vnější *theca folliculi externa*. Folikulární buňky se oddělují na kumulární a murální buňky. Kumulární buňky

se nachází v blízkosti oocytů se kterým tvoří tzv kumulo-oocytární komplex. Murální buňky se nachází u steny folikulu (Driancourt, 1991; Hurk & Zhao, 2004). Z funkčního hlediska je důležité, že kumulární buňky neobsahují receptory pro LH a signál pro dozrání a ovulaci (LH peak) vnímají nepřímo prostřednictvím EGF podobným peptidům (EGF like peptides) vylučovaných murálními buňkami. Folikulární vývoj je nakonec ukončen ovulací nebo atrésií (Eppig et al., 1997). Délka časového intervalu od nábory folikulů do kohorty rostoucích folikulů až po formování antra je u prasete zhruba 84 dní (Morbeck et al., 1992; Hunter, 2000).

Samotný folikulární vývoj po cyklickém recruitmentu vytváří folikulární vlny a je rozdělen do několika fází – recruitment, selekce a dominance (Hurk & Zhao, 2004). U druhů s dobře rozlišitelnými folikulárními vlnami (např. skot) začíná cyklický recruitment zvýšením produkce FSH a folikuly, které mají vytvořené dostatečné množství receptorů pro FSH, tedy mají schopnost na FSH reagovat, vstoupí do kohorty rostoucích folikulů (Fair, 2003). Rekrutované folikuly rostou a následně dojde k selekci druhově specifického počtu dominantních folikulů, které jsou zpravidla větší než ostatní folikuly v kohortě. Dominantní folikuly nakonec v reakci na vlnu LH ovulují. Ostatní rekrutované folikuly podlehnou atrésii (Beg & Ginther, 2006). Charakteristickým znakem dominantních folikulů je aktivita enzymu aromatáza, která je zodpovědná za produkci estrogenů (Yen et al., 2005). Syntéza estrogenu je zajištěna spoluprací mezi buňkami *theca folliculi interna* a granulózními buňkami. V reakci na působení LH vytváří buňky théky androgeny, které slouží jako substrát pro granulózní buňky. Enzymem aromatázou jsou totiž přeměněny na estrogény (Hillier et al., 1994). V reakci na inhibiční efekt progesteronu je v luteální fázi nízká hladina estrogenů a jejich hladina se zvyšuje až po luteolýze. Zvyšování hladiny estrogenů působí pozitivní zpětnou vazbou na uvolňování LH, což nakonec vede k LH vlně zodpovědné za ovulaci (Findlay et al., 2000; Knox et al., 2003).

U pohlavně dospělé prasnice se na vaječnicích nachází stála populace antrálních folikulů velikosti 1 – 6 mm v průměru. Na začátku estrálního cyklu, tedy po ovulaci, dochází k vývoji žlutých tělísek a zvýšení produkce progesteronu. Zároveň se krátce zvyšuje hladina FSH, která folikulům velikosti přibližně 1 mm umožní vývoj a brání jejich zániku (Driancourt, 2001; Knox et al., 2003). Nicméně, hladina FSH se po 5 dni estrálního cyklu snižuje, což je spojeno se zvýšením míry atrésie (Guthrie et al., 1995). Pokud nedošlo k oplození, dochází 14.-15. den k luteolýze žlutých tělísek a

snížení produkce progesteronu. Tím je odstraněn inhibiční vliv progesteronu na produkci gonadotropních hormonů a nastane druhé zvýšení hladiny FSH, které je důležité pro recruitment. Následkem recruitmentu vznikají na povrchu vaječníků ve folikulární fázi estrálního cyklu folikuly velikosti 6,5 mm (Knox et al., 2003). Z těchto folikulů jsou dále selektovány folikuly, kterou dorostou do ovulační velikosti. Schopnost projít selekcí mají pouze folikuly, které vytvořily dostatečné množství LH receptorů a jsou citlivé na FSH. V této době se totiž snižuje produkce FSH a ve vývoji mohou pokračovat pouze folikuly, které mají adekvátní schopnost reagovat na pulsativní sekreci LH i na nízké hladiny FSH (Prunier et al., 1993; Driancourt, 2001). Rekrutované folikuly, které nedosáhly dostačující velikosti, ztrácejí receptory pro FSH a kvůli tomu podléhají atresii (Lucy et al., 2001). Selektované folikuly se stávají dominantními a v průběhu několika dnů dosáhnou velikosti 8 – 10 mm a nakonec v reakci na LH vlnu ovulují. Na začátku cyklického recruitmentu je u prasnice rekrutováno více jak 50 folikulů, ze kterých nakonec ovuluje pouze část (Driancourt, 2001).

V procesu folikulogeneze a oogeneze hraje významnou roli programovaná buněčná smrt neboli apoptóza. Apoptóza je důležitým procesem pro udržení funkční zásoby primordiálních folikulů a později během vývoje hraje roli ve folikulární atresii. Na regulaci buněčné smrti se podílí mnoho antiapoptotických a proapoptotických proteinů. Např. v případě, že chybí Bcl-2, antiapoptotický člen rodiny proteinů B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), dochází ke snížení počtu oocytů a primordiálních folikulů. Stejnou roli má rovněž Bcl-x (Rucker et al., 2000). Naproti tomu buněčnou smrt podporuje proapoptotický faktor BAX, který je rovněž členem rodiny Bcl-2. Snížení exprese proteinu BAX v těle vede ke zvýšení počtu zárodečných buněk (Perez et al., 1999). Jako další důležitá signální dráha, která se podílí na regulaci buněčné smrti, je signální dráha kaspáz. Například deficience kaspázy 2 vede ke zvýšení počtu primordiálních folikulů (Bergeron et al., 1998).

2.1.3 Meiotické zrání

V období pohlavní dospělosti se objevuje charakteristická pulsativní sekrece LH hormonu, která mimo ovulaci spustí u meioticky kompetentních oocytů proces meiotického zrání. To znamená, že u oocytů nacházejících se do té doby v prvním meiotickém bloku, dojde k obnovení meiotického dělení (Wassarman & Albertini, 1994). Pro získání plné kompetence musí být oocyt schopný podstoupit jednak jaderné zrání, ale zároveň i získat cytoplazmatickou zralost. Jaderné zrání označuje změny

v jádře a rozdělení chromozómů při přechodu z prvního meiotického bloku ve fázi diplotenné do metafáze druhého meiotického dělení. Cytoplazmatická zralost zahrnuje akumulaci dostatečného množství RNA (mRNA, rRNA), proteinů a dalších látek, jakož i redistribuci organel a změny cytoskeletu. Dohromady je cílem těchto změn umožnit následující vývoj (Watson, 2007; Ferreira et al., 2009). Celkově je pro získání meiotické kompetence klíčové vytvoření zásoby cyklin dependentní kinázy 1 (CDK1, také označovaná jako $cdc2$ nebo $p34^{cdc2}$) a proteinu cyklinu B, jenž jsou regulátory buněčného cyklu (Chesnel & Eppig, 1995).

Před zahájením meiotického zrání se oocyt nachází v prvním meiotickém bloku. Hlavními faktory, které tento blok udržují, jsou cAMP, produkovaný enzymem adenylcykláza (Downs et al., 1989) a cGMP, tvořený guanylylcyklázou (Bornslaeger et al., 1984). Předpokládá se, že v oocytech se nacházející molekuly cAMP mohou pocházet ze dvou zdrojů. Zaprvé je to tvorba cAMP v folikulárních buňkách a jeho následný transport do oocytu přes gap junctions (Sela-Abramovich et al., 2006). Nicméně, pravděpodobnějším mechanismem je endogenní tvorba cAMP přímo v oocytu. V membráně oocytu se nachází konstitutivně aktivní receptor spojený s G proteinem 3 (GPR3), který v oocytu aktivuje adenylcyklázu zodpovědnou za produkci cAMP (Horner et al., 2003; Vaccari et al., 2008). Vysoká koncentrace cAMP aktivuje cAMP dependentní proteinkinázu A (PKA) (Richard et al., 2001) a aktivní PKA fosforyluje proteiny regulující aktivitu CDK1, jako je fosfatáza CDC25. Před zahájením meiotického zrání jsou na CDK1 přítomny inhibiční fosforylace a pro aktivaci CDK1 a následné obnovení meiozy je nutné tyto fosforylace odstranit. To je funkcí CDC25. Nicméně, v prvním meiotickém bloku je tato funkce CDC25 inhibována právě PKA (Kovo et al., 2006; Zhang et al., 2008). Současně PKA aktivuje kinázu Wee1B, která udržuje inhibiční fosforylaci CDK1 (Han & Conti, 2006).

Klíčovou roli v udržení prvního meiotického bloku má cGMP. V kumulárních buňkách se nachází membránový receptor natriuretického peptidu 2 (NPR2), který má guanylylcyklázovou aktivitu. NPR2 je aktivován prekurzorem natriuretického peptidu typu C (NPPC) produkovaného v murálních buňkách. cGMP produkovaný prostřednictvím NPR2 je přes gap junctions transportován do oocytu, kde inhibuje cAMP fosfodiesterázu PDE3A. Enzym PDE3A hydrolizuje cAMP a tím snižuje jeho koncentraci. Z toho důvodu inhibice PDE3A pomocí cGMP brání obnovení meiozy

v prvním meiotickém bloku (Norris et al., 2009; Zhang et al., 2010). Exprese NPR2 je stimulována přímo oocytem prostřednictvím produkce růstového diferenciačního faktoru 9 (GDF9) a kostního morfogenetického proteinu (BMP15) (Wigglesworth et al., 2013).

Meiotické zrání je zahájeno vlnou LH, která působí přes receptory nacházející se zejména na murálních buňkách folikulu (Amsterdam et al., 1975; Peng et al., 1991; Jeppesen et al., 2012). LH receptory patří do skupiny receptorů spojených s G proteiny a jejich aktivace vede ke zvýšení množství signálních molekul, a to cAMP a iontů vápníku (Ca^{2+}) (Lee et al., 2002). Aktivace těchto signálních drah v murálních buňkách vede nakonec u oocytu k zahájení meiotického zrání, jehož výrazným znakem je rozpad zárodečného váčku (germinal vesicle breakdown, GVBD) (Hsieh et al., 2007). Přenos aktivačního signálu z murálních buněk folikulu je zprostředkován ligandy EGF receptorů zahrnující epiregulin (EREG) a amphiregulin (AREG) (Kawamura et al., 2009). Receptory pro EGF se nachází na murálních i kumulárních buňkách, nejsou ale přítomny na oocytu (Park et al., 2004). EREG a AREG jsou syntetizovány jako neaktivní membránové proteiny a proteotickým štěpením vnější domény pomocí metalloendoproteáz jsou uvolňovány jako aktivní peptidy (Ashkenazi et al., 2005; Silvestre et al., 2011). Ty v konečném důsledku způsobí jednak aktivaci MAPK uzavírající gap junctions, a dále snížení hladiny cGMP (Sela-Abramovich et al., 2005; Panigone et al., 2008; Vaccari et al., 2009).

Po vlně LH dochází ke snížení exprese NPPC a produkce cGMP. To vede k omezení transportu cGMP z folikulárních buněk do oocytu. Z důvodu vymizení inhibičního vlivu cGMP na PDE3A dojde k její aktivaci a následné degradaci cAMP v oocytu (Kawamura et al., 2011). Současně po LH vlně je aktivován enzym MAPK, který fosforyluje connexin 42 vytvářející gap junctions. Tato fosforylace způsobí uzavření gap junctions a tedy uzavření cesty pro transport cGMP (Sela-Abramovich et al., 2005; Norris et al., 2008). Současně se MAPK podílí na formování dělicího vřeténka (Hurk & Zhao, 2004). V savčím oocytu jsou pro meiotické zrání důležité dvě izoformy MAPK a to ERK1 a ERK2 (Hurk & Zhao, 2004). V době zahájení meiotického zrání se zvyšuje exprese kinázy mos, která následně aktivuje mitogenem aktivovanou kinázu kinázu (MAPKK, neboli MEK). MEK je aktivační kinázou MAPK a aktivovaná MAPK následně aktivuje kinázu p90^{rsk} (Nebreda & Hunt, 1993; Sagata et al., 1989). Signální dráha mos/MEK/MAPK/p90^{rsk} je důležitá pro udržení vysoké aktivity

maturation promoting factor (MPF) v průběhu meiotického zrání. Kináza Myt1 inhibičně fosforyluje CDK1 a tím snižuje její aktivitu. Aktivní p90^{rsk} inhibičně fosforyluje Myt1 tím zabraňuje inhibiční fosforylaci MPF (Palmer et al., 1998).

Snížení množství cAMP je spojeno s aktivací MPF. MPF je komplexem složeným z kinázy CDK1 a cyklinu B. Cyklin B je regulační podjednotkou a změny v jeho množství výraznou mírou ovlivňují aktivitu MPF (Holt et al., 2013). V období růstu oocytů dochází k syntéze CDK1 a cyklinu B, které se spojují a vytváří neaktivní komplex pre-MPF. Meiotická kompetence je charakteristická výraznou zásobou pre-MPF v oocytu (Gordo et al., 2001). V neaktivní formě je pre-MPF udržována prostřednictvím inhibiční fosforylace CDK1 (na Tyr15 a Thr14) maskující vazebná místa pro ATP (Ferrell et al., 1991). Inhibiční fosforylace je zprostředkována kinázami Wee1B a Myt1, přičemž signální dráha cAMP/PKA zvyšuje aktivitu Wee1B (Mueller et al., 1995; Han et al., 2005). K aktivaci pre-MPF dochází po LH vlně, kdy se sníží hladina cGMP, následně i aktivita cAMP/PKA, což uvolní inhibici CDC25. Aktivní CDC25 odebere z CDK1 inhibiční fosforylaci a tím jí aktivuje (Lincoln et al., 2002). Aktivovaná MPF poté posiluje činnost CDC25 a zároveň inaktivuje Wee1B. Z toho důvodu vznikne pozitivní zpětná vazba vedoucí k autoamplifikaci MPF (Palmer et al., 1998). Aktivovaná MPF fosforyluje laminy tvořící jaderný obal a proteiny podílející se na kondenzaci chromatinu a organizaci cytoskeletu (Gordo et al., 2001).

GVBD je u oocytu dosaženo kvůli snížení hladiny cAMP (Hsieh et al., 2007). Aktivace fosfolipázy C v granulózních buňkách vede k hydrolýze fosfatidylinositolu a produkci inositoltrifosfátu a diacylglycerolu. Signalizací fosfolipázou C stimulovaná intracelulární mobilizace Ca²⁺ je rovněž spojená s influxem Ca²⁺ z extracelulárního prostředí. Ke zvýšení hladiny Ca²⁺ v oocytu po LH vlně může dojít pomocí přímého transportu Ca²⁺ z kumulárních buněk nebo pomocí transportu inositoltrifosfátu, který následně v oocytu indukuje uvolnění Ca²⁺. Zvýšení intracelulární hladiny vápníku je důležitým faktorem, který se podílí spuštění meiotického zrání. Ca²⁺ dále ovlivňuje aktivitu proteáz, které mohou odbourávat proteiny důležité pro buněčný cyklus (Homa, 1995). Ca²⁺ působí přes kalcium/kalmodulin dependentní protein kinázu II (CaMKII). Tato kináza reguluje koncentraci cyklinu B a vyvolává vydělení prvního polového tělíska (Lorca et al., 1993).

V průběhu meiotického zrání dojde k rozdělení chromozomů a cytoplazmy, ta je však rozdělena asymetricky. Většina cytoplazmy se při dělení dostane do sekundárního oocytu, naopak druhá buňka, polové tělíčko, obsahuje minimální množství cytoplazmy (Wassarman & Albertini, 1994). Rozdělení chromozomů v bivalentech je zprostředkováno tzv. mikrotubuly organizujícími centry (microtubule organizing centers, MTOCs). Sesterské chromatidy v bivalentech jsou spojeny proteiny kohesiny. Před rozestupem chromozomů musí být kohesiny rozštěpeny a to je zprostředkováno enzymem separázou, který je aktivován na začátku anafáze (Buonomo et al., 2000; Kudo et al., 2009). U meioticky zrajícího oocytu MTOCs vytvářejí pomocí polymerizace mikrotubulů tzv. astery. Po GVBD jsou mikrotubuly vycházející z protilehlých aster napojeny na kinetochory chromozomů a vzájemně propojeny. To následně umožní rozdělení chromozomů (Eichenlaub – Ritter, 2012).

Správné napojení mikrotubulů na kinetochory a následný rozchod chromozomů jsou kontrolovány a regulovány signální kaskádou spindle assembly checkpoint (SAC), zahrnující velkou řadu proteinů (např. Bub1, MAD1, aurora kináza) (Holt et al., 2013). V případě problému v připojení chromozomů není umožněno, aby meiotické zrání pokračovalo do anafáze (Hoyt, 2001). V tomto případě proteiny SAC inhibují protein CDC20 (cell division cycle protein 20), který jinak funguje jako koaktivátor enzymového komplexu anafázi podporující komplex/cyclosome (anaphase promoting complex/cyclosome, APC/C). APC/C řídí meiotické zrání a inhibice jeho aktivace vede k zastavení postupu meiozou (Eichenlaub – Ritter, 2012).

Jako další děj probíhající po vlně LH je expanze a mucifikace kumulárního obalu oocytu. Proteiny EREG a AREG uvolněné po vlně LH způsobí v kumulárních buňkách zvýšení produkce řady proteinů zapojených do expanze kumulárního obalu (např. cyklooxygenáza – 2, hyaluronan syntáza – 2 a pentraxin – 2) (Richards, 2005). Na zahájení kumulární expanze se dále mohou podílet oocytem produkované faktory, tzv. kumulární expanzi umožňující faktory (CEEF, cumulus expansion enabling factors) (Buccione et al., 1990; Procházka et al., 1991). Enzym cyklooxygenáza - 2 (COX-2) produkuje prostaglandin E2 (PGE2), jehož efektem je zvýšení produkce EREG a AREG a tedy amplifikaci reakce na vlnu LH (Ben-Ami et al., 2006). Současně COX-2 produkuje prostaglandiny zapojené do procesu ovulace (Lim et al., 1997). Samotná expanze je způsobena produkcí extracelulární matrix, která je složená převážně z hyaluronové kyseliny (Park et al., 2004; Ashkenazi et al., 2005). V průběhu kumulární

expanze dochází přerušení spojení pomocí gap junctions a tím k zabránění přenosu inhibičních látek z kumulárních buněk do oocyty. Tento mechanismus se podílí na zahájení meiotického zrání (Chen et al., 1990).

Celková délka jaderného zrání je druhově specifická, přičemž u prasete dosahuje 44 hodin (Knox et al., 2003). Po dokončení meiozy I pokračuje meiotické zrání až do metafáze druhého meiotického dělení, kde dojde k opětovnému zastavení v tzv. druhém meiotickém bloku. Oocyt nacházející se druhém meiotickém bloku je připravený na oplození spermií (Picton et al., 1998).

Průchod meiotickým zráním a druhý meiotický blok

Při postupu meiotickým dělením z anafáze I do metafáze II musí dojít ke změně v aktivitě MPF, neboť pro výstup z meiozy I je nutné krátkodobé snížení aktivity MPF. V druhém meiotickém bloku vykazuje MPF opět vysokou aktivitu, což právě druhý blok udržuje (Picard et al., 1985; Ito & Kashiwazaki, 2012). Na řízení průchodu meiotickým zráním se z velké části podílí APC/C. Proteinový komplex APC/C představuje ubiquitin ligázu připojující k vybraným proteinům ubiquitinovou značku označující tyto proteiny k proteolýze v proteasomu (Peters, 2006). Aktivita a substrátová specifita APC/C je ovlivněna vazbou koaktivátorů CDC20 nebo FZR1 (fizzy related protein 1) a fosforylací prostřednictvím MPF nebo polo-like kinázy I (PLK1) (Kramer et al., 2000; Jones, 2011). V době prvního meiotického bloku je APC/C spojen zejména s FZR1. Po zahájení meiotického zrání a zvýšení aktivity CDK1 dochází ke snížení vazby FZR1 a naopak se na APC/C naváže CDC20. Spojení APC/C a CDC20 následně vede k degradaci cyklinu B a securinu (Reis et al., 2007). Securin představuje inhibitor separázy. Degradace securinu pomocí APC/C vede k aktivaci separázy, která štěpí proteiny kohesiny držící sesterské chromatidy v bivalentech a tím umožňuje rozchod chromozomů (Nasmyth, 2001). Degradace cyklinu B vede ke snížení aktivity MPF, což umožní přechod přes anafázi do meiozy II. Na druhou stranu se v průběhu meiotického zrání zvyšuje exprese cyklinu B, jenž v konečném důsledku vede pouze k částečnému snížení hladiny cyklinu B. Předpokládá se, že kdyby došlo k plnému snížení cyklinu B, oocyt by vstoupil do S fáze buněčného cyklu. Tímto mechanismem je však vstupu do S fáze zabráněno (Iwabuchi et al., 2000; Holt et al., 2013).

Po průchodu meiozou I je meiotické zrání zastaveno v metafázi II v druhém meiotickém bloku, který je charakteristický vysokou aktivitou MPF (Picard et al., 1985;

Ito and Kashiwazaki, 2012). Vysoká aktivita MPF je udržena prostřednictvím inhibice APC/C pomocí tzv. cytostatických faktorů (CSF). CSF představuje řadu regulačních proteinů, přičemž klíčovou roli zaujímá signální dráha mos/MEK/MAPK/p90^{rsk} a protein Emi2 (Lorca & Castro, 2010). V druhém meiotickém bloku vykazuje mos/MEK/MAPK/p90^{rsk} vysokou aktivitu a jedním z cílů p90^{rsk} je protein Emi2. Fosforylace Emi2 prostřednictvím p90^{rsk} vede k vazbě Emi2 na APC/C a tím k inhibici její aktivity (Schmidt et al., 2006; Inoue et al., 2007; Lorca and Castro, 2010; Ito & Kashiwazaki, 2012).

Pro výstup z druhého meiotického bloku při oplození nebo partenogenetické aktivaci je nutné snížení aktivity CDK1. To je zprostředkováno aktivací APC/C a následnou degradací cyklinu B. Po oplození se ze spermie dostane do cytoplazmy oocyty fosfolipáza C zeta, která zvýší intracelulární hladinu Ca²⁺ (Saunders et al., 2002; Nixon et al., 2002). Tyto tzv. vlny Ca²⁺ aktivují v oocyty řadu signálních drah, přičemž jednou z nich je dráha Ca²⁺/kalmomodulin dependentní protein kinázy II (CaMKII). Aktivovaná CaMKII fosforyluje Emi2, což umožní následné rozpoznání Emi2 pomocí ubiquitin ligázy Skp1–Cullin–Fbox– β trcp (SCF ^{β trcp}) a jeho degradaci. Současně se po oplození snižuje aktivita signální dráhy mos/MEK/MAPK/ p90^{rsk} (Lorca and Castro, 2010; Nishiyama et al., 2010; Ito & Kashiwazaki, 2012).

2.2 Stárnutí oocytů

Oocyt nacházející se v druhém meiotickém bloku je plně vývojově kompetentní pouze omezenou dobu a v případě, že nedojde k oplození v tzv. optimálním okně pro fertilizaci, dochází postupně k negativním změnám souhrnně nazývaných jako postovulační stárnutí. Stárnutí vede k partenogenetické aktivaci, apoptóze nebo lýze oocytů (Miao et al., 2009).

Funkčními změnami, ke kterým dochází v procesu stárnutí oocytů, jsou: snížení oplozovací schopnosti (Lanman, 1968), zvýšení míry polyspermie po oplození (Badenas et al., 1989), partenogeneze (Blandau, 1952), zvýšení výskytu chromozomálních aberací (Szollosi, 1971), apoptózy z důvodu snížení exprese anti-apoptotického faktoru Bcl-2 a aktivaci kaspáz (Fujino et al., 1996; Gordo et al. 2002; Takai et al. 2007), snížení vnímavosti na aktivační stimuly (Szollosi, 1971), zahájení anafáze II (Xu et al., 1997), částečná exocytóza kortikálních granul (Szollosi, 1971), snížení aktivity MPF a MAPK (Kikuchi et al., 1995), epigenetické změny (Liang et al.,

2008) a narušení a/nebo zpomalení vývoje embryí nebo plodů (Lanman, 1968). V průběhu postovulačního stárnutí dále dochází k morfologickým a funkčním změnám cytoplazmatické membrány, *zona pellucida*, cytoskeletu a mitochondrií (Szollosi, 1971). Ty zahrnují např. zona hardening (Dodson et al. 1989), dysfunkci a pokles membránového potenciálu mitochondrií (Wilding et al., 2001), snížení produkce ATP (Ci et al., 1988), poruchy dělicího vřetene a ztráta chromosomální integrity (Wakayama et al. 2004).

Negativní změny spojené se stárnutím negativně ovlivňují oplozenis schopnost a vývojový potenciál oocyty jak v *in vivo*, tak v *in vitro* podmínkách (Miao et al., 2009). Změny v *zona pellucida* způsobené předčasnou exocytózou kortikálních granul a procesem zona hardening brání v interakci se spermii a tím fertilizaci (Lord & Aitken, 2013). Současně se u stárnoucích oocyty zvyšuje peroxidace lipidů, což může negativně ovlivnit schopnost spojení membrány spermie a oocyty (Takahashi et al. 2003). Pokud dojde ke spojení spermie a oocyty, je pro aktivaci oocytů klíčové spuštění a průběh vln Ca^{2+} . Nicméně, u stárnoucích oocytů je schopnost řízení hladiny Ca^{2+} narušena a to vede k abnormálním Ca^{2+} vlnám. Frekvence uvolňování Ca^{2+} je v těchto oocytech výrazně vyšší, ale amplituda je naopak podstatně menší než v čerstvých oocytech (Igarashi et al., 1997). Předpokládá se, že takto narušená signalizace Ca^{2+} spustí u oocytů po oplození místo vývojové dráhy spíše cestu vedoucí k apoptoze (Gordo et al., 2002).

Snížený vývojový potenciál embryí vzniklých oplozením stárnoucích oocytů je často důsledkem poruch dělicího vřetene a následným vznikem chromosomálních abnormalit (Mailhes et al. 1998; Wakayama et al. 2004). Přestože proces stárnutí výrazně snižuje vývojový potenciál, přesto dochází ke vzniku živých potomků vzniklých oplozením stárnoucích oocytů. Nicméně, u těchto potomků je zvýšená míra abnormalit a tyto potomci vykazují zpomalení růstu, opožděný vývoj, snížení reprodukčních schopností a zkrácení délky života (Tarin et al., 1999; Tarin et al., 2002). Předpokládá se, že faktory zodpovědnými za výskyt těchto abnormalit u mláďat jsou dysfunkční mitochondrie a narušený epigenetický profil a tím i exprese genů (Tarin et al., 2002; Liang et al. 2011).

Na vzniku negativních změn spojených s postovulačním stárnutím se podílí několik molekulárních mechanismů. Samotný proces stárnutí je urychlen přítomností

kumulárních buněk, kdy při stárnutí kumulo-oocytárních komplexů dochází ve zvýšené míře k partenogenetické aktivaci a apoptoze v porovnání s denudovanými oocyty (Wu et al., 2011). Důležitou roli hraje působení volných kyslíkových radikálů (ROS). Během stárnutí dochází k jejich hromadění a zároveň ke snižování antioxidační ochrany. To vede ke vzniku oxidačního stresu. V souvislosti se zvýšením oxidačním stresem dochází k poškození buněčných membrán a narušení DNA (Takahashi a kol., 2003; Lord et al., 2013). Celkově dochází k mnoha biochemickým změnám, které jsou zodpovědné za vznik stárnutí oocytů (Lord a Aitken, 2013). Jednou z klíčových je inaktivace MPF a tím snížení původně vysoké aktivity MPF. Vysoká aktivity MPF je důležitá pro udržení druhého meiotického bloku. V průběhu stárnutí dochází k postupnému snižování aktivity MPF, což je spojeno se zvýšením úrovně partenogenetické aktivace a fragmentace (Kikuchi et al., 2000).

Dysfunkce mitochondrií je dalším předpokládaným faktorem zodpovědným za negativní projevy stárnutí. Nenarušená funkce mitochondrií je důležitá jednak pro životaschopnost oocytů, tak i pro vývojový potenciál. U oocytů vystavených stárnutí se však ve zvýšené míře vyskytují abnormality mitochondrií, jako snížení mitochondriální integrity, ztráta membránového potenciálu mitochondrií (Wilding et al., 2001) a snížení produkce ATP (Chi et al., 1988). Narušená funkce mitochondrií je spojená se zvýšenou produkcí ROS a únikem proapoptotických faktorů jako je cytochrom c. Uvolněný cytochrom c je aktivátorem kaspáz a endonukleáz. Aktivace kaspáz vede k apoptotickému rozpadu (Fujino et al., 1996; Liu et al., 2009a).

Zabránění vzniku negativních projevů stárnutí a tím udržení kvality oocytů je faktorem umožňujícím zlepšení metod asistované reprodukce a biotechnologie. Ve vědecké literatuře je popsáno několik způsobů jak omezit projev stárnutí v in vitro podmínkách. Efekt na zpomalení stárnutí je znám např. v případě zvýšení koncentrace pyruvátu v kultivačním médiu (Liu et al., 2009b) nebo při suplementaci kultivačního média kafeinem (Kikuchi et al., 2002) či melatoninem (Lord et al., 2013). Stárnutí oocytů je ovlivněno i gasotransmitery, kdy třeba sulfan má protektivní efekt (Krejčová et al., 2015). V případě oxidu uhelnatého (CO) však efekt na stárnutí nebyl znám.

2.3.1 Oxid uhelnatý

Za faktory regulující fyziologické funkce byly dlouho považovány pouze peptidy, proteiny, lipidové deriváty a nukleové kyseliny. Plynné látky s výjimkou kyslíku byly

chápany jako nedůležité. V devadesátých letech minulého století bylo dokázáno, že faktor zodpovědný za relaxaci hladkého svalstva cév (endothelial cell-derived relaxing factor, EDRF) je plyn oxid dusnatý (NO) (Palmer *et al.*, 1987; Ignarro *et al.*, 1987). Význam objevu NO jako signální molekuly měl obrovský dopad na biomedicinský výzkum. Brzy po prokázání signální funkce NO bylo objeveno, že i oxid uhelnatý (CO) má pro fungování organismu důležitý význam.

Skutečnost, že v organismu vzniká CO jako meziprodukt při rozpadu hemu katalyzovaném mikrosomálním enzymem hem oxygenáza (HO), byla známa dlouho před objevem signální funkce NO (Tenhunen *et al.*, 1968). Endogenně vznikající CO byl považován pouze za odpadní meziprodukt, který má ve vysokých koncentracích negativní efekt. CO byl znám např. kvůli jeho schopnosti vázat se na hem a tím snižovat schopnost krve zásobit tkáň kyslíkem (Stewart, 1975). Pohled na významnost CO pro organismus se změnil krátce po prokázání signální funkce NO, neboť byla poznána fyziologická role CO v nervovém přenos (Verma *et al.*, 1993) a v relaxaci svaloviny análního sfinkteru (Rattan & Chadker, 1993). Postupně bylo poznáváno, že nízké koncentrace CO jsou důležitým faktorem pro správné fungování organismu. Nyní je známo, že systém HO/CO reguluje řadu buněčných funkcí a podílí se na ochraně buněk před negativním působením stresu (Wu & Wang, 2005). Poruchy ve funkci systému HO/CO vedou ke zdravotním komplikacím a poruchám v reprodukci. Nicméně, význam HO/CO v reprodukci prozatím není plně pochopen.

2.3.2 Signální dráha HO/CO

Reakce katalyzovaná HO je hlavním endogenním zdrojem CO. HO katalyzuje první a limitující krok v oxidativní degradaci hemu (Tenhunen *et al.*, 1968; Tenhunen *et al.*, 1969). Jednotlivé produkty katabolismu hemu mají v buňce význam. Fe^{2+} uvolněné z hemu indukuje expresi ferritinu (Einstein *et al.*, 1991) a Fe^{2+} exportéru ferroportinu (Delaby *et al.*, 2008). Společně ferritin a ferroportin účinně odstraňují redox-aktivní Fe^{2+} a tím minimalizují riziko oxidativního poškození indukovaného Fentonovou reakcí (Dunn *et al.*, 2014). Biliverdin a bilirubin jsou významné antioxidanty (Dennery *et al.*, 1995; Mireles *et al.*, 1999) schopné vychytávat ROS a zvyšovat aktivitu antioxidantních enzymů (Bay *et al.*, 2015).

Jsou známé dva izoenzymy HO, HO-1 a HO-2. Obě katalyzují identickou biochemickou reakci transformace hemu na biliverdin-IX α . Oba proteiny ve své

strukturu obsahují vysoce konzervovanou sekvenci 24 aminokyselin, která je považovaná za vazebné místo pro hem (Rotenberg et al., 1991; Maines, 1997) a sdílí podobný hydrofobní region, který slouží k přichycení proteinu k membráně (McCoubrey et al., 1993; Shibahara et al., 1985). Oba izoenzymy se však liší v enzymové kinetice, termostabilitě a imunoreaktivitě (Maines, 1992; Maines et al., 1986).

Indukovatelná izoforma, HO-1 (~32 kDa), je membránový protein připojený k endoplazmatickému retikulu (Yoshida & Kikuchi, 1978). V reakci na působení stresorů může docházet ke změnám v jeho lokalizaci, kdy je translokován do lipidových raftů (caveolae), mitochondrií a jádra (Dunn et al., 2014). Tato redistribuce HO-1 má signální funkci, přičemž např. v jádře se uplatňuje v regulaci transkripčních faktorů a ochraně buněk před působením oxidativního stresu (Biswas et al., 2014). Za fyziologických podmínek je HO-1 exprimována zejména v tkáních, které se účastní odbourávání erytrocytů, jako je slezina nebo kostní dřeň. V ostatních tkáních jsou hladiny HO-1 obvykle nízké, ale jeho exprese může být stimulována širokou škálou stresových podnětů (např. oxidativní a tepelný stres, hypoxie a působení cytokinů), přičemž zvýšení exprese má cytoprotektivní efekt (Ryter et al., 2006). V procesu indukce HO-1 jsou zapojeny například MAPK a nuclear factor- κ B (Kim et al., 2011). Schopnost HO-1 potlačovat oxidativní stres má i enzymaticky inaktivní forma (Hori et al., 2002). Mechanismus účinku enzymaticky inaktivní HO-1 prozatím není plně znám, ale je prokázáno, že HO-1 může vazbou na jiné proteiny měnit jejich aktivitu (Dennerly, 2013)

HO-2 (~36 kDa) je konstitutivně exprimovaný izoenzym s nejvyšší expresí v mozku a varlatech (Maines, 1997). Rovněž HO-2 je membránový protein endoplazmatického retikula. Zároveň ho lze lokalizovat i na vnější jaderné membráně (Ma et al., 2004) a endosomech (West and Oates, 2008). HO-2 nereaguje na transkripční aktivaci působením stresorů a jedinými dosud známými aktivátory exprese jsou glukokortikoidy (Maines et al., 1996) a vzhledem k této skutečnosti je kortizol považován za regulátor exprese HO-2 (Liu et al., 2000). HO-2 je zodpovědný stálou produkcí CO a vytváří ochranou linii proti buněčnému poškození například oxidativním stresem (Turkseven et al., 2007). Zároveň se předpokládá, že funguje jako senzor hladiny kyslíku, který se podílí v protektivní reakci buněk na hypoxii (Muñoz-Sánchez & Chánez-Cárdenas, 2014).

Mimo HO-1 a HO-2 byl popsán i HO-3. Nicméně v případě HO-3 nejspíše nedochází k jeho expresi v *in vivo* podmínkách a kvůli vysoké homologii HO-3 s HO-2 a chybějícím intronům v genu pro HO-3 je HO-3 popisován jako pseudogen pocházející z transkriptu HO-2 (Hayashi et al., 2004).

2.3.3 Buněčné cíle CO

Oxid uhelnatý ovlivňuje buněčné funkce prostřednictvím vazby na struktury obsahující přechodné kovy (např. Fe, Cu) (Boczkowski et al., 2006), z nichž nejznámější je hem. Ten je součástí velkého množství proteinů (např. sGC, cyklooxygenasa, cytochrom p450, cytochrom c oxidasa, iNOS), a z toho důvodu je zároveň i množství potenciálních cílů pro CO široké (Tsiftoglou et al., 2006). Vazbou CO na železo v hemoproteinu dochází ke konformační změně, která může měnit biologickou aktivitu proteinu (Roberts et al., 2004).

Společným cílem CO a zároveň NO je sGC. Vazbou CO nebo NO na hemovou skupinu sGC dochází ke zvýšení tvorby cGMP. Změny v hladině cGMP následně vedou k ovlivnění signálních drah (Furchgott and Jothianandan, 1991, Stone and Marletta, 1994). Prostřednictvím signální dráhy sGC/cGMP se CO podílí na regulaci tonu cév, ovlivňuje neurotransmisi a působí antiproliferativně (Ryter & Choi, 2015). V reprodukční soustavě NO např. touto dráhou inhibuje ovariální steroidogenezi (Ishimaru et al., 2001; Grasselli et al., 2001) a podílí se na udržení oocytů v prvním meiotickém bloku (Schwarz et al., 2014). Prozatím není prokázán vliv HO/CO na samičí reprodukční soustavu prostřednictvím signální dráhy sGC/cGMP, ale např. vzhledem k tomu, že i HO/CO ovlivňuje steroidogenezi (Alexandeanu & Lawson, 2003), může být i tento efekt CO zprostředkován přes sGC/cGMP. Nicméně, v porovnání s NO je schopnost vazby CO na sGC výrazně slabší a CO je považován spíše za endogenní modulátor NO/cGMP signální dráhy (Furchgott & Jothianandan, 1991; Ingi et al., 1996).

Interakce mezi CO a NO neprobíhá pouze v kompetitivní vazbě k efektorovým proteinům, ale i v přímé regulaci tvorby. CO vazbou na hemovou skupinu iNOS snižuje její aktivitu a tím tvorbu NO (Kim et al., 2008). Na druhou stranu NO zvyšuje expresi HO (Motterlini et al., 2002). Vzhledem k vzájemné provázanosti je CO považován jako zpětnovazebný inhibitor NOS, který omezuje vznik oxidačního stresu spojeného s nadprodukcí NO (Kim et al., 2008).

CO vazbou na mitochondriální cytochrom c oxidázu a/nebo na plazmatické membráně se nacházející NAD(P)H oxidázu zvyšuje tvorbu ROS, které v nízkých koncentracích fungují jako důležitý druhý posel (Bilban et al., 2008). Vazba CO na cytochrom c oxidázu způsobí únik volných elektronů z dýchacího řetězce a následnou tvorbu ROS (D'Amico et al., 2006; Taillé et al., 2005). ROS poté mohou působit na různé signální dráhy. CO indukované ROS prostřednictvím inhibice ERK 1/2 kinázy a snížením exprese cyklinu D1 inhibují proliferaci hladkého svalstva (Taillé et al., 2005). Dále CO indukované ROS např. přes aktivaci transkripčních faktorů Nrf-1, Nrf-2 a PPAR γ -coactivator-1 α zvyšují biogenezi mitochondrií. Tento proces umožní buňce nahradit poškozené mitochondrie a zvládnout období zvýšených metabolických nároků (Piantadosi et al., 2008; Suliman et al., 2007). Celkový efekt přechodného a mírného zvýšení produkce ROS je pozitivní, neboť tímto způsobem dochází k indukci antioxidantních enzymů, aktivaci cytoprotektivních genů a celkovému zvýšení odolnosti buněk proti působení stresorů (Finkel, 1998). Na druhou stranu nadbytek ROS je zodpovědný za narušení řady biologických funkcí (Agarwal et al., 2012). Nicméně, je prokázáno, že CO má schopnost bránit negativním efektům nadměrné produkce ROS (Ryter et al., 2006; Ryter & Choi, 2016).

Je prokázáno, že CO působí na buněčné funkce prostřednictvím MAPK (p38, ERK 1/2 a JNK) (Ryter et al., 2006; Kim et al., 2006). Modulace MAPK signální dráhy prostřednictvím CO je zodpovědná za cytoprotektivní, protizánětlivé, antiapoptotické a antiproliferativní vlastnosti CO (Ryter et al., 2006; Kim et al., 2006; Ryter & Choi, 2016). Kvůli tomu, že CO nemá schopnost přímo se vázat na MAPK, musí její aktivitu ovlivňovat přes jiné proteiny nebo signální dráhy. Například v případě p38 se předpokládá, že CO up-reguluje p38 prostřednictvím přechodného zvýšení hladiny ROS (Bilban et al., 2006) a/nebo přes dráhu sGC/cGMP (Wang et al., 2001). V savčím oocytu se p38 podílí na sestavení a regulaci dělicího vřetýnka, přičemž poruchy v tomto procesu vedou k zastavení buněčného cyklu (Ou et al., 2010). Rovněž se p38 v oocytech podílí na udržení druhého meiotického bloku (Miyagaki et al., 2014). Je ukázáno, že přechodné zdržení obnovení meiotického zrání *in vitro* podmínkách vede ke zlepšení vývojové kompetence (Nogueira et al., 2003; Vanhoutte et al., 2008). Z těchto důvodů by CO mohl být perspektivní regulátor meiotického zrání.

CO reguluje funkci široké řady iontových kanálů pro K⁺, Na⁺ a Ca²⁺. CO aktivací nebo inhibicí iontových kanálů reguluje různé fyziologické funkce. Např. CO zvýšením

aktivity BK_{ca} způsobí vasodilataci a prostřednictvím inhibice Kv_{2,1} může působit neuroprotektivně (Peers et al., 2015; Wilkinson & Kemp, 2011). V děložní svalovině se BK_{ca} podílí na zabránění zvýšení její aktivity během březosti a v přechodu ke stavu připravenosti na aktivitu v období nástupu porodu (Lorca et al., 2014). Prostřednictvím aktivace BK_{ca} se CO může podílet na udržení gravidity a regulaci nástupu porodu.

2.3.4 HO/CO v samičí reprodukční soustavě

Přítomnost HO je prokázána v ováriích (Alexandreaanu & Lawson, 2003), děloze a placentě (Odrnich et al., 1998; Ihara et al., 1998; Kreiser et al., 2003), přičemž distribuce izoform je odlišná dle buněčného typu. V ováriích jsou obě izoformy lokalizované v buňkách žlutého tělíska (CL) a folikulárních buňkách (granulózní buňky a buňky théky). Ve stromatu je přítomná pouze HO-2 (Alexandreaanu & Lawson, 2003; Harada et al., 2004; Murphy et al., 1991; Zenclussen et al., 2011). Přímou v oocytech je prozatím prokázána pouze přítomnost mRNA HO-1 (Pfeiffer et al, 2015).

Stejně jako v jiných tkáních, i v ováriích a děloze dochází v reakci na působení stresorů (např. oxidativního stresu, nadměrné akumulaci volného hemu) ke zvýšení exprese HO-1 (Murphy et al., 1991; Maines and Kutty, 1991; Cella et al., 2006; Zenclussen et al., 2014). Expresi HO zároveň ovlivňují hladiny hormonů a díky tomu dochází v průběhu estrální cyklu a gravidity ke kolísání exprese HO. V děloze míra exprese HO-1 pozitivně koreluje se zvýšením hladiny estrogenů a progesteronu. Expresi HO-2 pozitivně koreluje pouze s hladinou progesteronu (Acevedo & Ahmed, 1998; Cella et al., 2006; Zenclussen et al., 2014). U myši dochází k nejintenzivnější expresi HO-1 v období estru a právě v estru se u myši vyskytuje vrchol v hladině progesteronu (Zenclussen et al., 2014). Při zablokování aktivity HO prostřednictvím inhibitoru chromium mesoporphyrin (CrMP) dochází ke zkrácení délky estru (Alexandreaanu & Lawson, 2002). Významem zvýšení exprese HO-1 v děloze je pravděpodobně ochrana embrya před nepřiměřenou zánětlivou reakcí a vlivem nadbytečného volného hemu, kdy oba tyto děje mají prokázaný škodlivý efekt (Vinatier et al., 1995; Jeney et al., 2002; Zenclussen et al., 2014; Li et al, 2015). Tento předpoklad je potvrzen skutečností, že zvýšení exprese HO-1 v děloze koreluje se snížením hladiny volného hemu. Z těchto důvodů je aktivita HO-1 považována za klíčovou při udržení optimálního prostředí pro nidaci a implantaci (Zenclussen et al., 2014).

Změny v aktivitě HO v průběhu estrálního cyklu mohou mít vliv na vývoj a životnost folikulů. Při ovulaci dochází v ováriích k aktivaci zánětlivých procesů a uvolnění velkého množství hemu (Richards et al., 2002) a stejně jako v děloze může zvýšení aktivity HO-1 v estrální fázi cyklu bránit nadměrnému a škodlivému rozvinutí těchto procesů (Zenclussen et al., 2011; Li et al., 2015). U HO-1 deficientních myší totiž dochází ke snížené produkci oocytů, která ukazuje na poruchy v procesu ovulace. U získaných oocytů dochází po in vitro fertilizaci k sníženému procentu oplození. Rovněž se vyskytuje zvýšená míra apoptózy buněk CL (Zenclussen et al., 2011), přičemž toto zvýšení vede ke snížení schopnosti produkovat progesteron (Devoto et al., 2002). V případě, že je aktivita HO inhibována inhibitorem, je rovněž pozorováno snížení syntézy progesteronu (Alexandrea & Lawson, 2003). Up-regulace HO-1 vede ke zvýšení produkce CO (Vreman et al., 1999), který následně může aktivovat signální dráhy s cytoprotektivním efektem (Wu & Wang, 2005). Při deficienci HO-1 dochází ke snížení produkce CO (Chen et al., 2009), která vede ke zvýšení míry apoptózy (Brouard et al., 2000). Signální dráha HO/CO je tudíž faktorem zabraňujícím poruchám funkcí ovaríí.

Pro vývoj oplození schopného oocytu je důležitý plně funkční obal granulóznic buněk. V reakci na funkční stav granulóznic buněk dochází ke změnám v expresi izoforem HO. HO-1 dosahuje nízkých hodnot exprese ve funkčních folikulech, ale v atretických folikulech se exprese výrazně zvyšuje. V případě HO-2 je pozorován opačný trend míry exprese. Ve funkčních folikulech je exprese HO-2 výrazná a v atretických nízká. Vysoká míra exprese HO-1 v granulóznicích buňkách pocházejících z atretických folikulů je považována za důsledek působení stresových faktorů (Harada et al., 2004). Skutečnost, že v reakci na působení stresorů dochází ke zvýšení exprese HO-1 je často využíváno jako markeru zátěže buněk např. při oxidativním stresem. Bergandi et al. (2014) použili míru exprese HO-1 společně s iNOS jako marker kompetence oocytů. V kumulárních buňkách pocházejících z neoplozených oocytů byla pozorována vyšší exprese HO-1 a iNOS. Autoři výsledek vysvětlují působením oxidativního stresu, který jednak způsobí zvýšení exprese iNOS a HO-1, a dále sníží oplození schopnost oocytu. Rovněž autoři Pfeiffer et al. (2015) použili HO-1 jako jeden z markerů, jehož rozdílného zastoupení v oocytu může ovlivňovat kvalitu embryí.

Důležitost HO pro správné fungování samičích reprodukčních orgánů je zřejmá a naskýtá se otázka, zda by exogenní zvýšení exprese HO nebo dodání CO nepůsobili

pozitivně. Klinické využití při léčbě např. různých zánětlivých stavů je intenzivně zkoumanou oblastí (Ryter & Choi, 2016). Vztah modulace aktivity HO k steroidogenezi je prokázán několika pracemi. V in vivo pokusech na potkanech vede aplikace heminu (aktivátor HO) samicím ke zvýšení syntézy androstendionu a estradiolu. V případě inhibitoru HO CrMP dochází ke snížení syntézy progesteronu a androstendionu. Syntéza estrogenů se nemění. Faktorem zodpovědným za rozdílné změny ve steroidogenezi může být odlišný význam HO/CO pro různé dráhy steroidogeneze. Ke změnám v průběhu estrálního cyklu v reakci na změny v hladinách hormonů dochází pouze v případě aplikace inhibitoru HO, kdy se zkracuje délka estru (Alexandreaanu & Lawson, 2002, Alexandreaanu & Lawson, 2003). Naproti tomu deficiencie HO-1 u myší nedochází v průběhu březosti ke změnám v hladině progesteronu a estrogenů, a i když v reakci na působení estrogenů dochází během estrálního cyklu ke zvýšení aktivity HO (izoformy HO-1), samotný deficit HO-1 u myší hladiny pohlavních hormonů neovlivňuje (Zenclussen et al., 2011). CrMP představuje nespecifický inhibitor obou izoform HO a z toho důvodů nelze plně srovnávat vliv inhibice obou izoform HO s efektem deficiencie pouze HO-1. Rovněž významnost HO-1 v průběhu estrálního cyklu nebo březosti se může lišit. V estrálním cyklu totiž vede deficiencie HO-1 ke zvýšení apoptózy CL, z kterého lze usuzovat i na snížení schopnosti produkovat progesteron (Zenclussen et al., 2011). Nicméně využití modulace aktivity HO k ovlivnění estrálního cyklu je nepravděpodobné. Vzhledem k tomu, že proces vzniku oplozeného a vývojově kompetentního oocyty je pro reprodukci klíčový, naskytá se otázka, zda by bylo možné modulací aktivity HO ovlivnit kvalitu oocytů.

O terapeutických a preventivních možnostech využití systému HO/CO v průběhu březosti je možné uvažovat na základě několika prací. Aktivace HO-1 nebo aplikace CO vede ke snížení úmrtnosti plodů (Sollwedel et al., 2005; Zenclussen et al., 2006; Zenclussen et al., 2011) a pozitivnímu vlivu na růst plodu (Kreiser et al., 2002; Zenclussen et al., 2011). Systém HO/CO se rovněž může podílet na ochraně plodů před škodlivými vlivy patogenů. Během infekce *Listeria monocytogenes* dochází ke snížení exprese HO-1 a exogenní indukce HO-1 prostřednictvím cobalt protoporphyrinu (CoPP) vede k inhibici nástupu potratu (Tachibana et al., 2011). Podobný efekt byl zjištěn i při infekci bakterií *Brucella abortus*, kdy rovněž po aplikaci CoPP docházelo k potlačení abortů (Tachibana et al., 2008).

2.3.5 HO/CO v období březosti

Během březosti dochází k hemodynamickým a imunitním změnám, které jsou pro zdárný vývoj a donošení plodu nezbytné. Pokud k těmto změnám nedojde, zvyšuje se riziko poruch feto-maternální komunikace a spojení. Tyto komplikace vedou ve finále ke snížení plodnosti. Vliv HO/CO v průběhu březosti je v porovnání s ostatními funkcemi samičí reprodukční soustavy lépe prozkoumán, přičemž získané poznatky jsou shrnuty v několika pracech (Bainbridge & Smith, 2005; Levytska et al., 2013; George and Granger, 2013; Zenclussen et al., 2015; Schumacher & Zenclussen, 2015).

Lokalizace izoforem HO je odlišná v jednotlivých buněčných typech placenty (Yoshiki et al., 2000; Cella et al., 2006). V lidské placentě se HO – 1 nachází ve velkém množství ve vrstvách syncytiotrofoblastu. Naopak v cytotrofoblastu se vyskytuje v menším množství. Syncytiotrofoblast je přímo vystaven maternální krvi a tudíž potenciální imunologické reakci či zánětlivému stresu. Indukovatelná HO-1 nacházející se v cytotrofoblastu tudíž může přímo reagovat na tyto procesy (Yoshiki et al., 2000).

Ke změnám v expresi HO dochází v reakci na různé patologie březosti. Exprese HO v placentě se snižuje jak u spontánních (Zenclussen et al., 2005) tak uměle vyvolaných abortů myši (Zenclussen et al., 2002). Ke snížení exprese HO dochází i u patologií březosti, jako je pre-eclampsie, fetální růstová retardace nebo H-mola (Zenclussen et al., 2003; Lash et al., 2003). I když není jisté, zda je snížená exprese HO spouštěčem patologie nebo doprovodným signálem, je prokázáno, že HO/CO je pro správný průběh gravidity klíčový.

Deficience HO-1 byla spojena s neplodností (Poss & Tonegawa, 1997), nicméně u myši (HO-1^{-/-}) je prokázáno, že ve skutečnosti k zabřeznutí dochází, ale všechny plody zahynou během nitroděložního vývoje (Zenclussen et al., 2011). Rovněž inhibice obou izoforem HO prostřednictvím CrMP vede k nitroděložnímu úhynu plodů (Alexandreaanu & Lawson, 2002). Již samotná částečná deficience HO-1 (HO-1^{+/-} myši) vede ke zvýšené ztrátě plodů a tudíž sníženému počtu narozených mláďat (Zhao et al., 2009; Zenclussen et al., 2011).

Implantace je dějem, kde má HO-1 důležitou roli. U HO-1 deficientních myši dochází ke zpomalení připojení blastocyst k děložním epiteliálním buňkám (Zenclussen et al., 2011). Opožděná implantace má negativní dopad na placentaci,

vývoj fetoplacentární jednotky a následný růst plodu (Song et al., 2002). Deficience HO-1 vede k celkovému snížení hmotnosti fetoplacentální jednotky. Narušení funkce placenty vede k intrauterinní růstové retardaci plodů a nižší porodní hmotnosti úspěšně porozených mláďat (Zhao et al., 2009; Linzke et al., 2014; Zenclussen et al., 2011; Soleno et al., 2015).

HO-1 je v období placentace důležitá vzhledem k životnosti trofoblastu a zároveň jeho diferenciaci do zralého fenotypu. Během placentace dochází k diferenciaci trofoblastických kmenových buněk do tzv. giant cells (GCs). Tento proces je narušen při inhibici HO nespecifickým inhibitorem zine protoporphyrin (ZnPP), neboť se jednak výrazně snižuje viabilita trofoblastických kmenových buněk a zároveň je potlačena jejich diferenciaci do GCs. Rovněž placenta HO-1 deficientních myší vykazuje snížené množství GCs a zvýšené množství apoptózy. Schopnost zvrátit tento negativní efekt aplikací CO ukazuje na význam CO. Pokud je HO-1 deficientním myším aplikován CO, dochází k pozitivním změnám v placentě (zvětšení placenty, zvýšení počtu GCs, snížení rozsahu patologických změn a zvýšení fetální úmrtnosti). Pozitivní efekt má rovněž aplikace CO společně ZnPP (Kreiser et al., 2002; Zenclussen et al., 2011).

Během březosti dochází k výraznému zvýšení toku krve v uteroplacentálním spojení, který je usnadněn růstem a remodelací tzv. maternaly uterine spiral artery systému (Zenclussen et al., 2015). Důležitými buňkami, které regulují remodelaci maternal děložního vaskulárního systému jsou tzv. uterine natural killer cells (uNKs) (Hatta et al., 2011). V placentě myší deficientních pro HO-1 je menší počet uNKs a zároveň nižší exprese cytokinu IL-15, který je důležitý pro diferenciaci uNKs a jejich udržení ve fetomaternálním spojení. Snížení počtu uNKs je spojené s poklesem produkce angiogenních faktorů (Zhao et al., 2011; Linzke et al., 2014) a se zvýšením syntézy antiangiogenních faktorů (Cudmore et al., 2007). Celkově deficience HO-1 způsobuje výrazné zhoršení remodelace systému děložních spirálních srtérií, snížení velikosti fetoplacentální jednotky a intrauterinní růstovou retardaci plodů (Zhao et al., 2011; Linzke et al., 2014). Exogenní aplikace CO může zvrátit negativní efekt deficience HO-1, neboť u HO-1 deficientních myší dochází po aplikaci CO ke zvýšení počtu uNKs, produkce angiogenních faktorů a normalizace velikosti fetoplacentální jednotky a stavu SA (Linzke et al. (2014). Tyto efekty potvrzují význam HO/CO pro správný v průběhu březosti.

Důležitým mechanismem HO-1 v ochraně fetu před aborty je modulace regulačních T buněk a dendritických buněk. HO-1 se podílí na udržení dendritických buněk v nezralém stavu (tolerogenní), který je důležitý pro ochranu plodu před imunitní reakcí. Při inhibici HO-1 pomocí ZnPP dochází ke snížení množství regulačních T buněk ve fetoplacentárním spojení, které vede procesu odmítnutí plodu imunitním systémem. Na druhou stranu up-regulace HO-1 prostřednictvím (CoPP) udržuje tolerogenní dendritické buňky a vede ke zvýšení množství Treg, čímž zabraňuje odmítnutí plodu (Sollwedel et al., 2005; Zenclussen et al., 2007; Schumacher et al., 2012).

2.4. Význam česnekových derivátů v organismu

Česnekové palice jsou zdrojem velké řady sloučenin s biologickým efektem a využití česneku k medicínám účelům je známé již z antických dob. Česnek byl využíván k léčbě řady chorob od hemoroidů po hadí uštknutí. Byly mu připisovány baktericidní a fungicidní vlastnosti jakož i pozitivní vliv na sexuální funkce. I když nejsou všechny vlastnosti připisované česneku vědecky podleženy, je jeho efekt na organismus nesporný (Petrovska & Cekovska, 2010).

Za biologický efekt česneku jsou z velké části zodpovědné sirné sloučeniny (jako je allin nebo scordinin A a B). V neporušených česnekových palicích je hlavní sirnou sloučeninou allin. Po rozdrčení česneku je z vakuol uvolněn enzym allinasa, která allin hydrolyzuje na allicin, přičemž při této reakci vzniká jako meziproduct kyselina allylsulfonová. Samotný allicin je nestabilním produktem a v závislosti na podmínkách podstupuje rozpad za vzniku dalších sloučenin, mezi které patří diallyl sulfid (DAS), diallyl disulfid (DADS) a diallyl trisulfid (DATS) (Amagase, 2006; Swiderski et al., 2007; Corzo-Martinez et al., 2007). Zpracováním česnekových palic různými způsoby lze získat produkty s rozdílným zastoupením česnekových sloučenin. Extrakcí ethanolem při teplotě pod 0°C lze získat převážně allin a extrakcí ve směsi ethanolu a vody při teplotě 25°C je možné získat allicin. Dalším způsobem zpracování česnekových palic je dlouhodobá extrakce (až 20 měsíců) pomocí 15-20% ethanolu při pokojové teplotě. Tímto způsobem lze získat vyžralý česnekový extrakt (AGE-aged garlic extract), jenž z velké části obsahuje aminokyselinu S-allyl cystein (SAC), což je bezbarvá látka bez zápachu, stabilní ve vodném roztoku o neutrálním či mírně kyselém pH (Amagase, 2006; Majewski, 2014).

Je prokázáno, že česnekové sloučeniny mají např. antibakteriální a antivirální efekt, protizánětlivý vliv, snižují krevní tlak a hladinu krevního cukru (Dvořáková et al., 2015). Sírné sloučeniny obsažené v AGE mají vyšší a stálejší protektivní efekt v porovnání s ostatními česnekovými sloučeninami (Corzo-Martinez et al., 2007; Colín-González et al., 2012). Zároveň naše výsledky ukázaly, že kultivace oocytů v přítomnosti allynu narušila průběh jaderného zrání (nepublikované výsledky). Z těchto důvodů jsme se zaměřili na význam s-allyl cysteinu. Kvůli obsahu thiolové skupiny, která neutralizuje radikály, mezi které patří superoxidové aniony, peroxidy kyslíku, hydroxylové radikály a peroxyinitritové aniony, patří SAC mezi ne-enzymatické antioxidanty (Ide & Lau, 1999; Kim et al., 2006; Medina-Campos et al., 2007; Maldonado et al., 2011). Zároveň je prokázáno, že schopnost SAC chránit před singletovým kyslíkem je výraznější v porovnání s glutathionem nebo kyselinou lipoovou (Medina-Campos et al., 2007). V somatických buňkách tedy SAC chrání před oxidativním poškozením lipidů, DNA a proteinů (Imai et al., 1994; Numagami & Ohnishi, 2001; Colín-González et al., 2012). Mechanismus ochrany před negativním působením radikálů prostřednictvím SAC není pouze přímým vychytáváním ROS, nýbrž i indukci antioxidantních enzymů, kdy např. u myši vede podávání SAC ke zvýšení množství glutathionu (GSH) a aktivity/expresi katalázy, GSH peroxidázy nebo NAD(P)H:quinone oxidoreduktázy (Hsu et al., 2004; Lawal & Ellis, 2011). Současně podávání SAC vede k aktivaci Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2). Nrf2 je transkripčním faktorem, který reguluje expresi antioxidantních proteinů, které chrání před buněčným poškozením (Kalayarasan et al., 2008; Lawal & Ellis, 2011). Nrf2 signální dráha je známá aktivací exprese HO-1 (Loboda et al., 2016) a z toho důvodu se HO-1 může z velké části podílet na efektu SAC.

Dalším efektem SAC je inhibice prooxidačních enzymů. V reakci na působení oxidativního stresu dochází k aktivaci indukibilní NOS (iNOS), která následně produkuje velké množství NO. Přestože NO je důležitou signální molekulou regulující řadu fyziologických procesů, zvýšené hladiny NO mohou působit negativně, a to prostřednictvím tvorby reaktivních forem dusíku. Z toho důvodu deregulace hladiny NO může vést ke snížení životaschopnosti buněk (Domenice, 2004; Chirino et al., 2006). Při suplementaci SAC aktivovaným makrofágům nebo hepatocytům je prokázáno, že dochází ke snížení produkce NO a expresi iNOS. Předpokládá se, že SAC snižuje produkci NO prostřednictvím snížení aktivace nukleárního faktoru kappa B, který je

transkripčním faktorem regulujícím expresi genů důležitých pro imunitu, zánětlivé reakce, buněčný růst a buněčnou smrt (Aktan et al., 2004; Sun, 2017). Mezi další potenciálně prooxidační enzymy, jejichž aktivitu může SAC snižovat, patří xanthine oxidáza, NADPH oxidáza a cyclooxygenáza (Cruz et al., 2007; Demirkaya et al., 2009; Colin-Gonzalez et al., 2011).

SAC, stejně jako některé ostatní česnekové sloučeniny, má schopnost v buňkách zvyšovat množství H₂S (Wang et al., 2010). Gasotransmitter H₂S je signální a cytoprotektivní molekulou, která je zapojena do regulace řady fyziologických funkcí a podílí se na ochraně tkání a orgánu před působením oxidativního stresu (Chuah et al., 2007; Kimura, 2015).

2.5 Ovlivnění *in vitro* zrání oocytů

Zrání v *in vitro* podmínkách (IVM – *in vitro* maturation) je cestou, jak získat relativně jednoduchým způsobem dostatečné množství oplozeníšopných oocytů, které lze využít v biotechnologických metodách jako je klonování nebo transgeneze. Právě průběh meiotického zrání významným způsobem ovlivňuje životaschopnost a vývojový potenciál oocytů (Gilchrist & Thompson, 2007). Přestože IVM protokoly dosáhly výrazného pokroku, je kvalita oocytů získaných IVM snižena v porovnání s oocytami dozralými v *in vivo* podmínkách. U prasat se první úspěšné IVM povedlo provést již v roce 1974 (Motlík & Fulka, 1974), ale až roce 1985 se u prasat podařilo získat živé potomky z IVM dozrálých oocytů (Hanada et al., 1986). Nasledujícím vývojem kultivačních systémů se podařilo dosáhnout stavu, kdy takřka všechny (≥90%) oocyty použité pro IVM dozrají do stádia MII (Moor et al., 1990; Blondin et al., 1996), ale vývojový potenciál do stádia blastocysty je u IVM dozrálých oocytů stále znatelně snížený v porovnání s *in vivo* dozralými oocytami (Nagashima et al., 1996). Jelikož stav jaderného zrání u IVM oocytů lze považovat jako normální, předpokládá se, že cytoplazmatické zrání je v IVM podmínkách nedostačující nebo narušené (Yanez et al., 2016). Cytoplazmatické zrání zjednodušeně zahrnuje přípravu oocytů na oplození, aktivaci a embryonální vývoj a dochází při něm ke změnám v množství mRNA transkriptů, obsahu proteinů, post-translačním modifikacím proteinů a strukturním změnám organel a cytoskeletu (Kastrop et al., 1991; Levesque & Sirard, 1994; Armstrong, 2001). Současně je pro úspěšné cytoplazmatické zrání důležitá přítomnost kumulárních buněk, přičemž kompaktní kumulární obal s větším počtem vrstev kumulárních buněk koreluje se zlepšeným vývojovým potenciálem (Abeydeera,

2002). U prasete má přítomnost kumulárních buněk pozitivní vliv na průběh meiotického zrání, množství GSH v oocytech, distribuci kortikálních granul, oplozeníschopnost a aktivitu histone H1 kinázy (Yamauchi & Nagai, 1999). Současně můžou kumulární buňky poskytovat oocytům energetické zdroje (Eppig, 1996) a snižovat míru oxidativního stresu (Tanghe et al., 2002).

Pro docílení optimálního jaderného a cytoplazmatického zrání je vhodná suplementace kultivačního média. Mezi nejčastěji používaná média pro kultivaci prasečích oocytů patří TCM-199, NCSU23, NCSU37, minimal essential médium, Waymouth médium a Tyrodeho laktát-pyruvát médium, přičemž do médií je často přidávána folikulární tekutina (follicular fluid; FF) (Coy & Romar, 2002; Gilchrist & Thompson, 2007; Gil et al., 2010). Předpokládá se, že principem pozitivního ovlivnění oocytů prostřednictvím přidání FF je schopnost FF chránit před oxidativním stresem a dodat do média specifické látky (Takemoto et al., 2004). Za účelem napodobení *in vivo* podmínek jsou do kultivačního média rovněž přidávány hormonální látky, zahrnující FSH, LH, equiní choriový gonadotropin (eCG), lidský choriový gonadotropin (hCG) nebo estradiol (Coy & Romar, 2002). Hormonální látky mohou být v kultivačním médiu přítomny po celou dobu IVM, nebo jsou v druhé polovině kultivace odebrány a IVM pokračuje bez hormonálních látek (Funahashi & Day, 1993; Funahashi et al., 1994). Postupy IVM jsou dále ovlivněny předpokladem, že v *in vitro* podmínkách je narušená synchronizace jaderného a cytoplazmatického zrání. Jako řešení tohoto problému je možné využít IVM metody, kdy je na specifickou dobu zastaveno jaderné zrání prostřednictvím specifického inhibitoru, který je v další části IVM odebrán, aby oocyty mohly plně meioticky dozrát. Jedním z těchto způsobů je suplementace kultivačního média dibutyryl cAMP (db-CAMP), což způsobí u izolovaných oocytů inhibici zahájení jaderného zrání. Po 20-22 hod. jsou oocyty přesunuty do média bez db-CAMP, kde jsou dále kultivovány. Tímto způsobem IVM lze dosáhnout lepší vývojové kompetence oocytů (Funahashi et al., 1997; Gilchrist & Thompson, 2007). Dalšími způsoby synchronizace jaderného a cytoplazmatického zrání je časově omezená kultivace oocytů v médiu obsahujícím látky cilostamid nebo mirlinon, což jsou inhibitory PDE3 (Vanhoutte et al., 2008; Diece et al., 2013) nebo přidání aktivátoru adenylát cyklázy forskolinu (Eppig, 1989; Gilchrist & Thompson, 2007).

Je ukázáno, že cytoplazmatické zrání lze zlepšit suplementací kultivačního média. Přidání cysteaminu, cysteinu nebo β -mercaptoethanolu do kultivačního média

vede po oplození ke zlepšení tvorby samčích prvojader a současně i následujícího embryonálního vývoje (Gruppen et al., 1995; Eppig, 1996; Maedomari et al., 2007). Tyto látky zvyšují v oocytech množství GSH, který se ve velké míře podílí na ochraně buněk před oxidativním stresem. V průběhu meiotického zrání dochází ke zvýšení obsahu GSH v oocytech a při zablokování tohoto procesu je narušena oplozeníschopnost oocytů (Yoshida et al., 1993; Tatemoto et al., 2000; Chloe et al., 2010). Před negativním působením oxidativního stresu může oocyty chránit suplementace kultivačního média antioxidanty, kdy např. kyselina askorbová má pozitivní vliv na funkce dělicího vřetene (Choi et al., 2007). Podobně metabolity retinalu (retinoidy) zlepšují cytoplazmatické zrání a následný vývojový potenciál (Almiñana et al., 2008). Jaderné a cytoplazmatické zrání prasečích oocytů lze dále zlepšit suplementací růstovými faktory, jako je epidermální růstový faktor (EGF). Po přidání EGF do kultivačního média při IVM dochází ke zlepšení oplozeníschopnosti a vývojového potenciálu (Li et al., 2002).

3 Hypotézy a cíle

Stanovili jsme hypotézu, že lze zvýšit kvalitu prasečích oocytů kultivovaných v *in vitro* podmínkách prostřednictvím suplementace kultivačního média donorem oxidu uhelnatého nebo S-allyl cysteinem.

Pro potvrzení formulované hypotézy jsme stanovili následující cíle:

- 1) Vyhodnotit vliv suplementace kultivačního média donorem oxidu uhelnatého na kvalitu stárnoucích prasečích oocytů. Jako dílčí cíle jsme stanovili:
 - a) vyhodnotit přítomnost obou izoform enzymu hemoxygenázy v průběhu stárnutí prasečích oocytů,
 - b) vyhodnotit vliv donoru CO na morfologické znaky stárnutí prasečích oocytů,
 - c) vyhodnotit vliv donoru CO na průběh apoptózy prostřednictvím přítomnosti aktivované kaspázy-3 v průběhu stárnutí prasečích oocytů.
- 2) Vyhodnotit vliv suplementace kultivačního média donorem oxidu uhelnatého na meiotické zrání prasečích oocytů. Jako dílčí cíle jsme stanovili:
 - a) vyhodnotit přítomnost proteinů a mRNA obou izoform enzymu hemoxygenázy v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů,
 - b) vyhodnotit vliv donoru CO na jaderné zrání prasečích oocytů,
 - c) vyhodnotit vliv donoru CO na produkci reaktivních forem kyslíku v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů,
 - d) vyhodnotit vliv donoru CO na množství mitochondrií v prasečích oocytech v průběhu meiotického zrání,
 - e) vyhodnotit vliv donoru CO na hladinu glutathionu (GSH) v průběhu meiotického zrání.
- 3) Vyhodnotit vliv suplementace kultivačního média S-allyl cyteinem na meiotické zrání prasečích oocytů. Jako dílčí cíle jsme stanovili:
 - a) vyhodnotit vliv S-allyl cysteinu na jaderné zrání prasečích oocytů,
 - b) vyhodnotit vliv S-allyl cysteinu na kumulární expanzi na základě produkce kyseliny hyaluronové,
 - c) vyhodnotit vliv S-allyl cysteinu na produkci reaktivních forem kyslíku v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů,
 - d) vyhodnotit efekt meiotického zrání v médiu obsahujícím S-allyl cystein na časný embryonální vývoj.

4 Materiál a metody

4.1 Získ materiálu a kultivace oocytů v *in vitro* podmínkách

Prasečí vaječníky byly získávány z odporážených prasniček nacházejících se v neznámé fázi estrálního cyklu. Odebrané vaječníky byly transportovány v termolahvích naplněných fyziologickým roztokem (0,9 % chlorid sodný) o teplotě 39 °C. Kumulo-oocytární komplexy (COCs) byly získávány aspirací folikulární tekutiny z folikulů o velikosti 2 – 5 mm pomocí injekční stříkačky s jehlou 20G. Pod stereomikroskopem byly z folikulární tekutiny vybírány COCs s neporušenou cytoplazmou a kompaktním kumulárním obalem.

Před *in vitro* kultivací byly oocyty třikrát promyty v kultivačním médiu. Kultivace probíhala ve čtyřjamkové destičce 4-well multidish (Nunc, Denmark) v 1 ml modifikovaného kultivačního média MI99 (Sigma-Aldrich, USA) obsahujícího hydrogen uhličitán 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, Holland) a 10% (v/v) fetální bovinní sérum (GibcoBRL, Life Technologies, Deutschland) v podmínkách řízené atmosféry 5% CO₂ ve směsi se vzduchem při 39°C. U experimentálních skupin zaměřených na hodnocení meiotického zrání byla délka kultivace následující: 0 hod. (získ oocytů ve stádiu GV), 24 hod. (získ oocytů ve stádiu MI), 48 hod. (získ oocytů ve stádiu MII). V případě experimentů zaměřených na hodnocení stárnutí byly oocyty zbaveny kumulárních buněk a následně vyselektovány pouze meioticky dozrálé oocyty (MII) s vyděleným prvním pólovým tělískem. Vybrané oocyty byly kultivovány po dobu 24, 48 nebo 72 hod. ve stejných podmínkách jako v případě meioticky zrajících oocytů (kultivační médium bez gonadotropních hormonů). Suplementace kultivačního média u meioticky zrajících a stárnoucích oocytů probíhala v závislosti na experimentální skupině.

4.2 Vliv suplementace kultivačního média donorem CO, inhibitorem HO nebo S-allyl cysteinem (SAC)

- 1. experimentální skupina:** meioticky zrající a stárnoucí oocyty byly kultivovány v kultivačním médiu obsahujícím donor CO: CORM-2 (tricarbonyl dichlororuthenium (II) dimer; Sigma–Aldrich GmbH, Munich, Germany) o koncentracích 5, 25, 50 a 100 μM, rozpuštěného v dimethyl sulfoxidu (DMSO) nebo CORM-A1 (sodium boranocarbonate; Sigma–

Aldrich GmbH, Munich, Germany) o koncentracích 25, 50 a 100 μM rozpuštěného v H_2O . Za účelem potvrzení efektu CO byla kontrolní skupina kultivována v kultivačním médiu obsahujícím ruthenium (III) chlorid (inaktivní CORM-2; iCORM-2; Sigma–Aldrich GmbH, Munich, Germany) nebo inaktivní CORM-A1 (iCORM-A1). iCORM-A1 byl získán rozpuštěním CORM-A1 v 0.1 M HCl, disociací CO a následnou neutralizací pH na 7,4.

- 2. experimentální skupina:** meioticky zrající a stárnoucí oocyty byly kultivovány v kultivačním médiu obsahujícím inhibitor HO Zn-protoporphyrin IX (Zn-PP IX; Sigma–Aldrich GmbH, Munich, Germany) v koncentracích 2.5, 5 and 25 μM , rozpuštěného v DMSO. Kontrolní skupina byla kultivována v kultivačním médiu obsahujícím pouze DMSO.
- 3. experimentální skupina:** Meioticky zrající oocyty byly kultivovány v kultivačním médiu obsahujícím S-allyl cystein (Sigma Aldrich, USA) o koncentracích 0.1, 0.5, 1 a 5 mM rozpuštěného v H_2O . Kontrolní skupina byla kultivována v kultivačním médiu obsahujícím pouze H_2O .

4.3 Real-time polymerázová řetězová reakce

Metodou real-time polymerázová řetězová reakce (RT-PCR) byla sledována přítomnost mRNA HO-1 a HO-2, přičemž na detekci byly použity vzorky ze zrajících oocytů. RNA získaná z oocytů byla přepsána do cDNA pomocí High Capacity cDNA Achieve kitu (Applied Biosystems, USA) v konečném množství 100 μl . Na základě znalosti sekvence HO-1 a HO-2 byly vytvořeny specifické primery určené k amplifikaci produktů (viz. tab. 1).

Gene	Forward primers 5'–3'	Reverse primers 5'–3'	TaqMan probe 5'–3'	Gene bank accession number	Annealing temperature (°C)
HO-1	TCCCAGGTGCCGCTCAT	CCGTTGCCACCAGAAAGC	CGATGGGTCCTGACACT	NM_001004027.1	60
HO-2	TGAGAAAACAAGCACCCAATAAAA	CCGCAGACAAGATGCTGACA	CAGATGCTAAAGCCTG	NM_001244412.1	60

Tab. 1. Sekvence použitých primeru pro RT-PCR

Na samotnou RT-PCR byl použit standardní Taq-Man PCR kit protocol (Applied Biosystems, USA). Reakce probíhala v 10 μl reakční směsi obsahující 500 nM genově specifických primeru, 200 nM TagMan MGB prob, 5 μl Fast TagMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, USA), 1 μl cDNA a nuclease-free vodu. Pro reakci byl použit 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, USA). Na základě získaných dat bylo relativní množství mRNA pro jednotlivé izofomy vypočítáno pomocí aritmetické rovnice $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ dle Ct metody a vyjádřeno v porovnání k GAPDH jako endogenní kontrole.

4.4 Western blot

Přítomnost proteinů HO-1, HO-2 a CAS-3 byla hodnocená metodou Western blot (WB). Připravené vzorky oocytů byly lyzovány a proteiny separovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a z gelu elektroforeticky přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Membrána byla inkubována s monoklonálními primárními protilátkami: anti-heme oxygenase 1, anti-heme oxygenase 2 (ABNOVA; USA; 1:1000) nebo cleaved caspase-3 (Asp175) (Cell Signaling Technology, Danvers, USA; 1:1000). Po inkubaci následovalo promytí membrány od nenávané protilátky a inkubace se sekundární protilátkou - Mouse IgG (Amersham GE Healthcare, Life Sciences, United Kingdom; 1:30,000) nebo rabbit IgG (Amersham GE Healthcare, Life Sciences, United Kingdom; 1:120,000). Reakce byla vizualizována pomocí Enhanced chemiluminescence Western blotting detekčního systému (GE HealthcareLife Technologies, USA).

4.5 Imunocytochemie

Lokalizace proteinů HO-1, HO-2 a CAS-3 ve zrajících a stárnoucích oocytech. Po ukončení příslušné doby kultivace oocytů byla z oocytů odstraněna *zona pellucida* prostřednictvím 0,1 % pronázy. Následně byly oocyty fixovány v 2,5% roztoku paraformaldehydu v PBS při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny, přičemž po uplynutí 30 minut byl fixační roztok vyměněn za nový. Následně byla membrána oocytů permeabilizována 0,5% roztokem Tritonu X ve fosfátovém pufru (PBS) s 0,01 % BSA. Roztok byl po 5 minutách a po 1 hodině vyměněn za nový. Poté byly oocyty opláchnuty v roztoku PBS s 0,1% Tween 20 a inkubovány s primární monoklonální protilátkou specifickou pro daný protein (anti-heme oxygenase 1, anti-heme oxygenase 2; ABNOVA; Taiwan; 1:200; nebo anti-cleaved caspase-3 (Asp175); Cell Signaling Technology, Danvers, USA; 1:400). Inkubace probíhala přes noc (14-16 hodin) ve vlhku při teplotě 4 °C v médiu obsahujícím 0,1 % BSA a 0,01 Tween 20 v PBS. Po uplynutí doby kultivace byly oocyty třikrát propláchnuty v roztoku o složení 0,1% Tween 20 v PBS a následně byly kultivovány se sekundární protilátkou anti-mouse IgG konjugovanou s fluorescein-5-isothiocyanate (FITC, Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Germany; 1:100) nebo anti-rabbit IgG konjugovanou s FITC (ThermoFisher Scientific, Rockford, USA; 1:500). Inkubace se sekundární protilátkou probíhala při laboratorní teplotě v roztoku 0,1 % BSA a 0,01 Tween 20 v PBS po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byly oocyty 3x propláchnuty v roztoku o složení 0,1% Tween 20 v PBS.

Chromatin oocytů byl barven pomocí 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI; Sigma-Aldrich). Pro vyloučení nespecifické vazby sekundární protilátky byla ke každému experimentu provedena kontrola, která nebyla inkubována s primární protilátkou. Preparáty byly snímány na konfokálním skenovacím mikroskopu (Zeiss, Germany) a intracelulární lokalizace a distribuce proteinů byla hodnocena stanovením intenzity signálu pomocí analýzy obrazu NIS Elements 3.4. (Nikon, Japonsko). Získaná data byla vyjádřena jako průměrná intenzita signálu FITC fluorescence, sníženého o nespecifickou intenzitu signálu dané kontrolní skupiny.

4.6 Hodnocení stádia meiotického zrání oocytů

Po příslušné době kultivace byly oocyty zbaveny kumulárních buněk a následně fixovány po dobu minimálně 48 hod. v roztoku ethanolu:kyselina octová (3:1), barveny orceinem a vyhodnoceny pod mikroskopem s fázovým kontrastem. Podle fáze jaderného zrání byly oocyty hodnoceny jako: oocyty ve stádiu zárodečného váčku (GV; oocyty se zachovalou jadernou membránou), pozdní diakineze (LD; oocyty s jednotným, kondenzovaným chromatinem), metafáze I (MI; oocyty s chromozomy uspořádanými v metafázní figuře), metafáze II (MII; oocyty s vyděleným prvním polovým tělískem) (Motlík et Fulka, 1976).

4.7 Hodnocení *in vitro* stárnutí oocytů

Po uplynutí dané doby prodloužené kultivace byly oocyty fixovány po dobu minimálně 48 hod. v roztoku ethanolu:kyselina octové (3:1), barveny orceinem a vyhodnoceny pod mikroskopem s fázovým kontrastem. Na základě morfologických znaků byly oocyty rozděleny do skupin: intaktní oocyty (oocyty ve stádiu metafáze II, anafáze II nebo telofáze II), partenogeneticky aktivované oocyty (embrya a oocyty obsahující prvojádra), apoptotické oocyty (označované fragmentované; oocyty obsahující apoptotické váčky pod zonou pellucidou) a lysované oocyty (oocyty se ztrátou integrity a porušenou cytoplazmatickou membránou) (Petrová et al., 2004).

4.8 Kinázová aktivita

Kinázová aktivita byla hodnocena na základě sledování aktivity MPF a MAPK. Po dané době meiotického zrání v přítomnosti SAC byly oocyty denudovány a ke každému vzorku obsahujícím 15 oocytů bylo přidáno 5 ml extrakčního roztoku a takto připravené vzorky byly zamrazeny (-80°C). Aktivita MPF a MAPK byla hodnocena na základě schopnosti fosforylace specifických substrátů (histon H1 (H1) a myelin basic

protein (MBP)). Kinázová reakce byla zahájena přidáním 5 µl roztoku obsahujícím 100 mM 3-[n-morpholino] propanesulfonic acid pH 7.2, 20 mM para-nitrophenyl phosphate, 40 mM β-glycerolphosphate, 20 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 0.2 mM EDTA, 5 µM cAMP-dependentní inhibitor proteinkináz, 2 mM benzamidine, 40 µg/ml leupeptin, 40 µg/ml aprotinin, 600 µM ATP, 2 mg H1/ml, 3 mg MBP/ml) and 500 µCi/ml [γ-³²P]ATP (GE Healthcare Life Sciences, UK). Reakce probíhala 30 min. při teplotě 30°C a ukončena byla přidáním 10 µl Laemliho vzorkového pufru a povařením po dobu 3 min. Po elektroforetickém rozdělení v 15% SDS PAGE gelu byly proteiny obarveny pomocí Coomasie Blue R250. Intenzita signálu byla měřena prostřednictvím IP-plate, FLA 7000 reader (GE Healthcare Life Sciences, USA) a Multi-Gauge 2.0 software (Fujifilm, Japan). Získaná data byla relativně vyjádřena vzhledem k aktivitě MPF a MAPK v oocyttech ve stádiu GV.

4.9 Intenzita kumulární expanze

Vyhodnocení probíhalo na základě produkce hyaluronové kyseliny (HA). Po uplynutí dané doby kultivace byly kumulo-oocytární komplexy 4xpropláchnuty ve 450 µl PBS-PVA přenášením pomocí 50 µl automatické pipety. Poté byly oocyty zbaveny kumulárních buněk. Médium obsahující kumulární buňky bylo přeneseno do 1,5 ml mikrozkušavky Eppendorf a skladováno při - 20 °C. Vzorky s kumuly byly po rozmrazení vystaveny digesci lyázou ze *Streptomyces hyalurolyticus* (20 µl/ml; Sigma-Aldrich, USA) při 39 °C přes noc. Vzorky byly poté centrifugovány (5 minut, 10 000 rpm při 4 °C) a proměřeny na spektrofotometru Helios Epsilon (Verkon, Czech Republic) při 216 nm proti slepému vzorku PBS-PVA s lyázou ze *Streptomyces hyalurolyticus*. Na základě koncentrace štěpných produktů byla stanovena koncentrace HA. Standardní křivka byla vytvořena z ředící řady zásobního 1% roztoku vysokomolekulárního HA v PBS (Contipro Group, Czech Republic) vystaveného štěpení lyázou ze *Streptomyces hyalurolyticus* (300 I.U/ml, Sigma-Aldrich, USA). Dle standardní křivky byla odečtena koncentrace HA ve vzorcích.

4.10 Vyhodnocení produkce reaktivních forem kyslíku

Produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) byla měřena u meioticky zrajících oocytů (24 a 48 hodin) a partenogeneticky aktivovaných oocytů po 22 hodinách kultivace. Za účelem zjištění produkce ROS byly oocyty po uplynutí dané doby kultivace barveny 10 µM 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (Sigma-Aldrich, USA) po dobu 20 min. při teplotě 39°C. Následně byly oocyty montovány na podložní

sklíčko a snímány pomocí konfokálního skenovacího mikroskopu (Leica SPE). Získané snímky byly hodnoceny v programu NIS Elements. Data byla vyjádřena jako relativní intenzita signálu vzhledem ke kontrolní skupině.

4.11 Hodnocení vývojové kompetence

Pro vyhodnocení vývojové kompetence byly meioticky dozrálé oocyty (48 hod.) zbaveny kumulárních buněk. Poté byly oocyty partenogeneticky aktivovány prostřednictvím kalcium ionoforu A23187 (25 μ , Sigma-Aldrich, USA) působícího po dobu 5 min.. Následně byly oocyty kultivovány v médiu obsahujícím 6-dimethyl aminopurin (DMAP, 2mM, Sigma-Aldrich, USA) po dobu 2 hod. Následně byly oocyty kultivovány v modifikovaném médiu M199 bez gonadotropních hormonů. Partenogeneticky aktivované oocyty byly kultivovány 22 hod. a následně vyhodnoceny. Jako partenogeneticky aktivované oocyty byly hodnoceny oocyty s vytvořenými prvojádry. Aktivační potenciál byl hodnocen jako poměr zygot s jedním nebo dvěma prvojádry a dělicích se embryí vzhledem k ostatním oocytům. Časně embryonální dělení bylo vyjádřeno jako poměr dělicích se embryí vzhledem k aktivovaným oocytům.

4.12 Statistické hodnocení

Získaná data byla statisticky hodnocena v programu SAS 9.0 (SAS Institute Inc., USA) a STATISTICA. Všechny experimenty byly minimálně 3x opakovány. Statisticky signifikantní rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny analýzou rozptylu (ANOVA) a mnohonásobné porovnání pomocí Scheffeho metody. Hladina významnosti byla stanovena na $P < 0,05$.

5 Publikované práce

5.1 Anti-apoptotický efekt oxidu uhelnatého během *in vitro* stárnutí prasečích oocytů

Oxid uhelnatý (CO) má prokázané cytoprotektivní vlastnosti, nicméně jeho význam v oocytech byl dosud neznámý. Stárnutí oocytů je procesem, kdy dochází k postupnému snižování jejich životaschopnosti a naším cílem bylo zabránění tomuto procesu. Z těchto důvodů jsme stanovili hypotézu, že suplementace kultivačního média donorem CO může zvýšit životaschopnost stárnoucích prasečích oocytů. Vzhledem ke skutečnosti, že endogenně je za produkci CO zodpovědný enzym hemoxygenáza (HO), bylo zároveň naším cílem detekovat obě izoformy HO (HO-1 a HO-2) a určit vliv inhibice HO na průběh stárnutí oocytů. Celkově jsme prokázali, že signální dráha HO/CO je zapojena do regulace životaschopnosti prasečích oocytů a současně, že *in vitro* kultivace stárnoucích oocytů v přítomnosti donoru CO snižuje podíl apoptotických oocytů.

Imunocytochemickou metodou je prokázali přítomnost obou izoforem HO v prasečích oocytech a zároveň jsme zjistili, že v průběhu *in vitro* stárnutí dochází k nárůstu exprese obou izoforem HO. Rovněž se obě izoformy HO lišily lokalizací v oocytech, kdy HO-1 převládala v jaderné/perichromozomální oblasti a HO-2 v oblasti cytoplazmy. Nejvyšší exprese obou izoforem HO bylo dosaženo u oocytů stárnoucích 72 hodin, kdy v porovnání s expresí HO-1 nebo HO-2 u meioticky dozrálých oocytů (MII) se exprese HO-1 zvýšila 6.7 ± 1.3 krát, a exprese HO-2 celkem 3.1 ± 0.6 krát. V somatických buňkách je známo, že se exprese HO-1 zvyšuje jako odpověď na působení řady faktorů (např. oxidativní stres) a zvýšená exprese HO-1 snižuje produkci ROS a potlačuje apoptosu (Ryter, Alam & Choi, 2006; Pileggi et al, 2001; Li et al., 2016). Izoforma HO-2 je obecně považována za konstitutivně exprimovaný protein, který je zodpovědný za stabilní produkci CO a jehož míra exprese nereaguje na působení stresových faktorů (Turkseven et al., 2007; Muñoz-Sánchez & Chánez-Cárdenas, 2014). V několika studiích je však prokázáno, že se i exprese HO-2 může zvýšit v reakci na působení stresových faktorů, což má následně cytoprotektivní efekt (Kim et al., 2008; Ding et al., 2011).

U somatických buněk je prokázáno, že inhibice HO prostřednictvím Zn-protoporphyrinu IX (Zn-PP IX) vede k apoptóze (Hirai et al., 2007). Rovněž v našich experimentech jsme ukázali, že u stárnoucích oocytů má inhibice HO negativní efekt

a zvyšuje míru apoptozy. Efekt inhibitoru HO-1 a HO-2 Zn-PP IX na průběh *in vitro* stárnutí jsme prokázali u oocytů stárnoucích 48 hodin, kdy se v porovnání s kontrolní skupinou snížil podíl intaktních oocytů o 11.1-12.9% a podíl apoptotických oocytů se zvýšil o 5.6-9.4% v závislosti na koncentraci Zn-PP IX. U oocytů stárnoucích 24 hodin se vliv inhibitoru HO projevil pouze u nejvyšší použité koncentraci inhibitoru (25 μM). Vzhledem ke skutečnosti, že ve vyšších koncentracích může Zn-PP IX inhibovat rovněž syntázu oxidu dusnatého (NOS) a rozpustnou guanylyl cyklázu (sGC) (Luo & Vincent, 1994; Grundemar & Ny, 1997), nemůžeme vyloučit přítomnost nescifické inhibice v našich experimentech. Na druhou stranu, Appleton et al. (1999) uvádí, že Zn-PP IX je v nízkých koncentracích (do 5 μM) selektivním inhibitorem HO s minimálním efektem na aktivitu NOS a sGC. Z toho důvodu předpokládáme, že se v našich experimentech mohl efekt nescifické inhibice projevit pouze u koncentrace 25 μM . U oocytů stárnoucích 72 hodin nebyl pozorovatelný významný efekt inhibice HO.

Na somatických buňkách je prokázáno, že signální dráha HO/CO ovlivňuje apoptózu prostřednictvím modulace aktivity proapoptotických a antiapoptotických faktorů. CO potlačuje míru apoptózy např. prostřednictvím zvýšení exprese antiapoptotického faktoru Bcl-2 a snížením aktivity kaspázy-3 (Zhang et al., 2003, Cepinskas et al., 2007). Z našich experimentů je zřejmé, že CO potlačuje apoptózu rovněž u stárnoucích prasečích oocytů. Zjistili jsme, že po 48 a 72 hodinách stárnutí v přítomnosti donoru CO (CORM-2 nebo CORM-A1) došlo k významnému zvýšení podílu intaktních oocytů a snížení apoptotických oocytů. Zároveň stárnutí v přítomnosti donoru CO významně snížilo aktivitu kaspázy-3, přičemž tento efekt se projevil již u oocytů stárnoucích 24 hodin a byl významný i po 48 a 72 hodinách stárnutí.

Předpokládáme, že efekt CO ve stárnoucích oocytech je komplexní, neboť v somatických buňkách CO reguluje apoptotickou dráhu prostřednictvím řady mechanismů. Jedním z cílů CO v oocytech může být c-jun kináza (JNK). Na somatických buňkách je prokázáno, že CO má schopnost inhibovat aktivitu JNK (Morse et al., 2003). Současně je ukázáno, že inhibice JNK vede u stárnoucích oocytů k potlačení apoptózy (Sedmíková et al., 2013). Dále může CO potlačovat apoptózu prostřednictvím modulace hladiny Ca^{2+} . V somatických buňkách CO snižuje cytoplazmatické množství Ca^{2+} (Lin & McGrath, 1988; Gende, 2004; Lim et al., 2005), přičemž u stárnoucích oocytů může uvolnění Ca^{2+} do cytoplazmy způsobit zahájení buněčné smrti (Gordo et al., 2002; Zhu et al., 2016). Dále CO v somatických buňkách

zvyšuje expresi důležitého antiapoptického faktoru Bcl-2 a snižuje expresi proapoptických faktorů Bid a Bax (Zhang et al., 2003; Wang et al., 2007a).

Uvedené výsledky jsou součástí publikace: Němeček D., Dvořáková M., Heroutová I., Chmelíková E., Sedmíková M. (2017). Anti-apoptotic properties of carbon monoxide in porcine oocyte during in vitro aging. PeerJ 5: e3876

5.2 Vliv suplementace kultivačního média donorem CO na meiotické zrání prasečích oocytů

Meiotické zrání je komplexním procesem, který je regulován řadou faktorů jako jsou např. kinázy MPF a MAPK. Mezi regulátory meiotického zrání lze řadit i gasotransmitery, což jsou endogenně produkované plynné molekuly se signální funkcí. V případě NO a H₂S je již známo, že jsou zapojeny do regulace meiotického zrání (Bu et al., 2003; Hattori & Tabata, 2006; Nevorál et al., 2014). Na druhou stranu význam CO v průběhu meiotického zrání je dosud neznámý. Vzhledem k tomu, že mezi jednotlivými gasotransmitery dochází ke vzájemným interakcím a navíc je CO sám o sobě signální molekulou, která v somatických buňkách reguluje buněčný cyklus a působí antiapoptoticky, lze předpokládat, že CO může ovlivňovat i meiotické zrání. Z těchto důvodů jsme stanovili hypotézu, že signální dráha HO/CO je zapojena do regulace meiotického zrání oocytů a že suplementace kultivačního média donorem CO může zvýšit kvalitu prasečích oocytů. Na základě získaných výsledků předpokládáme, že je CO zapojen do regulace průběhu meiotického zrání a zároveň snižuje oxidativní stres.

Imunocytochemickou metodou jsme prokázali přítomnost proteinů a metodou RT-PCR mRNA obou izoform HO v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů. Během meiotického zrání (přechod GV-MI-MII) jsme neprokázali změny v množství mRNA HO-1 a HO-2 a ani proteinu HO-1. V případě HO-2 docházelo v průběhu meiotického zrání ke snížení jeho exprese, kdy se exprese HO-2 snížila o 21% (oocyty ve stádiu MI) a 50% (oocyty ve stádiu MII) v porovnání s oocyty ve stádiu GV. Současně jsme při posouzení exprese proteinů HO zjistili rozdílnou lokalizaci HO-1 a HO-2, kdy HO-1 převládala v oblasti jadra/perichromozomální oblasti a HO-2 v oblasti cytoplazmy. HO-1 představuje inducibilní izoformu, jejíž exprese se zvyšuje v reakci na působení řady stresorů (Ryter et al., 2006; Kim et al., 2011). Ze získaných výsledků předpokládáme, že náš systém *in vitro* kultivace nepředstavuje v průběhu meiotického zrání dostačující stresový faktor pro zvýšení exprese HO-1. Isoforma HO-2 je považována za konstitutivně aktivní enzym, který je v tkáních zodpovědný za bazální aktivitu HO (Turkseven et al., 2007; Muñoz-Sánchez & Chánez-Cárdenas, 2014). Předpokládáme tedy, že izoformy HO-1 a HO-2 neregulují výrazným způsobem průběh meiotického zrání. Tento předpoklad zároveň potvrzují výsledky získané posouzením vlivu inhibice obou izoform HO prostřednictvím ZnPP IX. Vliv inhibice na průběh meiotického zrání jsme hodnotili na základě posouzení jaderného zrání u

oocytů kultivovaných v přítomnosti inhibitoru ZnPP IX o koncentracích 1, 2.5, 5, 10 a 25 μM . Inhibitor ovlivnil jaderné zrání pouze v koncentraci 5 μM , kdy došlo ke snížení podílu oocytů dozrálých do stádia MII o 5% v porovnání s kontrolní skupinou (99.2% MII). Ostatní koncentrace inhibitoru neměly signifikantní vliv na průběh jaderného zrání oocytů. Na druhou stranu lze předpokládat, že HO ovlivňuje vývojový potenciál, neboť je popsáno, že oocyty pocházející z HO-1 deficientních myší mají sníženou oplozeníschopnost (Zenclussen et al., 2011). Rovněž je otázkou jakou měrou se podílí na ovlivnění oocytů aktivita HO nacházející se v kumulárních buňkách. Autoři Bergandi et al. (2014) prokázali, že lidské kumulární buňky získané z neoplozených oocytů vykazují zvýšenou expresi HO-1. Tento výsledek je vysvětlen pravděpodobným působením oxidativního stresu, jehož efektem je snížení oplozeníschopnosti oocytů, přičemž kumulární buňky se tomuto negativním efektu snaží bránit prostřednictvím zvýšení exprese HO-1. Zároveň je nutné uvést, že zvýšená exprese HO nemusí vždy znamenat cytoprotektivní efekt. Při výrazně zvýšené expresi HO-1 se může projevit efekt tzv. overexpresse, kdy z důvodu výrazné aktivity HO-1 dochází k nadměrnému uvolnění železa, které může působit cytotoxicky (Suttner & Dennerly, 1999). Vzhledem ke skutečnosti, že jsme nesledovali časný embryonální vývoj u oocytů zrajících v přítomnosti inhibitoru HO, nemůžeme říci, zda došlo k ovlivnění vývojového potenciálu.

CO je důležitou signální molekulou vznikající aktivitou HO. Při kultivaci prasečích oocytů v přítomnosti donoru CO CORM-2 jsme prokázali, že dochází ke snížení podílu oocytů dozrálých do stádia MII. Vliv donoru CO na meiotické zrání prasečích oocytů jsme hodnotili na základě jaderného zrání u oocyty zrajících v přítomnosti CORM-2 o koncentracích 5, 50 a 100 μM . Při kultivaci v médiu obsahujícím 5 μM CORM-2 jsme nezjistili efekt na jaderné zrání. V případě kultivace v médiu obsahujícím 50 nebo 100 μM CORM-2 došlo k zastavení jaderného zrání, kdy v koncentraci 50 μM dozrálo do stádia MII 68% oocytů a v koncentraci 100 μM 51% oocytů (kontrolní skupina, 84% MII). Na základě předběžných výsledku předpokládáme, že CORM-2 nezpomaluje, ale zastavuje meiotické zrání, neboť po 72 hodinách meiotického zrání nedošlo k meiotickému dozrání do stádia MII a hodnocené oocyty se nacházely v MI fázi meiotického zrání.

Současně jsme u oocytů meioticky zrajících v přítomnosti CORM-2 zjistili sníženou produkci ROS, přičemž tento efekt byl prokazatelný již u koncentrace 5 μM , u které byl neprokazatelný efekt na jaderné zrání. Pozorovaný efekt CORM-2 na produkci ROS byl závislý na koncentraci, kdy vyšší koncentrace CORM-2 výrazněji

snižovala produkci ROS. Efekt ROS ve vysokých koncentracích je bezesporu negativní, na druhou stranu se však v nízkých koncentracích ROS podílí na regulaci meiotického zrání (Pandey et al., 2010; Tiwar & Chaube, 2016). Z toho důvodu může snížení množství ROS vést k inhibici meiotického zrání, kdy např. suplementace kultivačního média neenzymatickými antioxidanty kyselinou askorobovou a 3-tert-butyl-4-hydroxyanisol vede k inhibici meiotického zrání (Pandey & Chaube, 2014). Za efekt inhibice meiotického zrání prasečích oocytů prostřednictvím CO můžou být zodpovědné i další signální dráhy. Jednou z nich je signální dráha JNK, kdy v somatických buňkách působí CO jako inhibitor JNK (Morse et al., 2003) a v oocytech vede inhibice JNK k zastavení meiotického zrání (Huang et al., 2011).

Přestože v tuto chvíli nevíme, jakým mechanismem CO ovlivňuje meiotické zrání prasečích oocytů, je otázkou, zda suplementace kultivačního média donorem CO v průběhu meiotického zrání vede ke zlepšení kvality oocytů. V řadě případů je prokázáno, že dočasná inhibice meiotického zrání vede následně ke zlepšení vývojové kompetence (Dieci et al., 2013; Vanhoutte et al., 2008). Zjistit zda má podobný efekt i CO je naším cílem v následujících experimentech.

5.3 Význam signální dráhy hemoxygenáza/oxid uhelnatý v samičí reprodukční soustavě

Oxid uhelnatý (CO) představuje důležitou signální molekulu regulující řadu buněčných procesů. Endogenně vzniká CO činností enzymu hemoxygenáza (HO), který je znám ve dvou izoformách (HO-1 a HO-2). HO-1 představuje inducibilní izoformu, jejíž exprese se výrazně zvyšuje v reakci na působení stresorů (např. oxidativní stres). HO-2 je konstitutivně exprimovanou izoformou, která je zodpovědná za bazální produkci CO. Endogenně vytvořený nebo exogenně dodaný CO zvyšuje ochranu buněk před stresory a reguluje buněčný metabolismus. Za tyto efekty je zodpovědná schopnost CO modulovat aktivitu řady signálních drah, mezi které patří např. guanylyl cykláza a tím míra produkce cGMP, nitrid oxid syntáza a produkce NO a v neposlední řadě aktivita MAPK. CO je nepostradatelný pro správné fungování organismu a na základě výsledků řady vědeckých prací je prokázáno, že místem působení CO je i samičí reprodukční soustava. Během březosti je CO důležitý pro správné fungování fetoplacentální jednotky a celkově pro přežitelnost plodu. Současně je ukázáno, že CO ovlivňuje např. steroidogenezi, životnost žlutého tělíska a současně oplozeníschopnost oocytů. Přestože se naše znalosti o funkci CO v reprodukční soustavě samic významně rozšiřují, stále je zde velké množství neznámých a například o funkci CO v oocytech nemáme téměř žádné informace. Z těchto důvodů jsme současné poznatky o významu hemoxygenázy a CO v samičí reprodukční soustavě zpracovali ve formě review a publikovali ve vědeckém časopise: Němeček D., Dvořáková M., Sedmíková M. (2017). Heme oxygenase/carbon monoxide in the female reproductive system: an overlooked signalling pathway. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 8(1), 1–12.

5.4 Antioxidační vlastnosti S-allyl cysteinu během meiotického zrání prasečích oocytů a časného embryonálního vývoje

S-allyl cystein (SAC) představuje stabilní česnekovou sloučeninu, která v somatických buňkách potlačuje oxidativní stres, snižuje míru apoptozy a zvyšuje životaschopnost buněk (Tsai et al., 2011, Cervantes et al., 2013). Z těchto důvodů jsme stanovili hypotézu, že meiotické zrání v přítomnosti SAC může snížit oxidační stres a tím zvýšit kvalitu oocytů. Zjistili jsme, že SAC potlačuje produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) ve zrajících oocytech a zároveň ovlivňuje časný embryonální vývoj. Z těchto důvodů považujeme SAC jako potenciální suplement kultivačního média, který může zlepšovat kvalitu oocytů.

Kultivace oocytů v *in vitro* podmínkách je charakteristická zvýšenou produkcí ROS v porovnání s *in vivo* podmínkami. V případě, že je produkce ROS v oocytech zvýšena nad fyziologickou hodnotu, může v meioticky zrajících oocytech dojít k destabilizaci MPF, snížení množství antiapoptotických faktorů a spuštění apoptózy a současně dochází k ovlivnění i následujícího embryonálního vývoje (Chaube et al., 2008; Corrêa et al., 2008; Chaube et al., 2014; Khazaei and Aghaz, 2017).

Jako markery meiotického zrání jsme použili jaderné a cytoplazmatické zrání a produkci hyaluronové kyseliny. Jaderné zrání bylo ovlivněno pouze v přítomnosti nejvyšší použité koncentrace SAC (5 mM), kdy došlo ke snížení podílu meioticky dozrálých oocytů. Z toho důvodu nebyla koncentrace 5 mM použita v dalších experimentech. V ostatních koncentracích SAC nedošlo k ovlivnění jaderného zrání, cytoplazmatického zrání (aktivity MPF/MAPK) a produkce hyaluronové kyseliny. Předpokládáme, že produkce ROS v našich *in vitro* podmínkách nedosahovala takové míry, která by negativně ovlivnila námi použité markery meiotického zrání. Zároveň Alvarez et al., (2015) uvádí, že prasečí oocyty jsou relativně resistantní proti negativnímu efektu ROS.

Na druhou stranu jsme prokázali, že meiotické zrání prasečích oocytů v přítomnosti SAC nejen výrazně snižuje množství ROS, ale zároveň ovlivňuje následující embryonální vývoj po partenogenetické aktivaci. Při posouzení vlivu SAC na produkci ROS v prasečích oocytech jsme zjistili, že meiotické zrání v přítomnosti SAC vede ke snížení produkce ROS jak u meioticky zrajících (MI, 24 hod.; MII, 48 hod.) tak následně i u partenogeneticky aktivovaných oocytů (22 hod. po partenogenetické aktivaci). V případě meioticky zrajících oocytů (MI; MII) vedla kultivace v přítomnosti SAC ke snížení produkce ROS o 82.9–91.6% (kultivace do

stádia MI) a o 86.4–99.1% (kultivace do stádia MII). U oocytů meioticky dozrálých v přítomnosti SAC a následně partenogeneticky aktivovaných došlo ke snížení produkce ROS o 57,8–66,3 % (po kultivaci 22 hod.). Současně meiotické zrání v přítomnosti SAC zvýšilo po partenogenetické aktivaci míru rýhování o 41.7–43.3% v porovnání s kontrolní skupinou (8.3%). Je prokázáno, že rychleji se dělicí embrya mají lepší vývojový potenciál v porovnání s pomalu se dělicími embryi (Isom et al., 2012; Nakai et al., 2014) a z toho důvodu považujeme efekt SAC na časný embryonální vývoj prasečích embryí jako pozitivní. Současně předpokládáme, že si embrya vzniklá z oocytů kultivovaných v přítomnosti SAC zachovala zvýšený antioxidační potenciál.

Za námi pozorovaný efekt výrazného snížení hladiny ROS u oocytů zrajících v přítomnosti SAC můžou být zodpovědné oba stavební prvky SAC, cystein a allylová skupina, které oba mají prokázané antioxidační vlastnosti (Chung, 2006). Zároveň SAC nemusí působit pouze jako antioxidant snižující hladinu ROS, ale i nepřímo prostřednictvím zvýšení aktivity antioxidačních enzymů jako je kataláza a GSH peroxidáza (Hsu et al., 2004) a současně zvýšením množství GSH, jakožto důležitého antioxidantu (Kohen & Nyska, 2002). Dalším důležitým mechanismem účinku SAC může být schopnost zvyšovat množství gasotransmiteru sulfanu, který následně může ovlivnit řadu signálních drah (Kamoun, 2004; Szabo, 2007) a je zapojen i do regulace meiotického zrání prasečích oocytů (Nevoral et al., 2014). Dále může SAC zvýšit expresi HO-1, která se podílí na ochraně buněk nejen před oxidačním stresem, ale i před širokou škálou buněčných stresorů (Park et al., 2014; Shi et al., 2015; Ryter and Choi, 2016).

Výsledky vlivu S-allyl cysteinu na prasečí oocyty jsou součástí publikace: Dvořáková M., Heroutová I., Němeček D., Zámotná, 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.

5.5 Vliv česnekových sloučenin na buněčné funkce

Česnek (*Allium sativum*) je již po dlouhou dobu používán v léčitelství jako přirozený prostředek léčby řady zdravotních problémů. Česnek obsahuje velké množství biologicky aktivních látek a právě kombinace těchto látek je zodpovědná za pozitivní efekt česneku na organismus. Současně vzniká řada látek s výrazným biologickým efektem až zpracováním česnekových palic. Mezi látky získané přímo z česneku nebo jeho zpracováním patří zejména allin, allicin, diallyl sulfid, diallyl disulfid, diallyl trisulfid a S-allyl cystein. U těchto látek je prokázáno, že zlepšují funkce imunitní soustavy, kardiovaskulární soustavy a působí proti rakovinným buňkám. Za pozitivní efekt česnekových sloučenin je z velké části zodpovědná jejich schopnost působit antioxidantně. Česnekové sloučeniny snižují tvorbu reaktivních forem kyslíku a současně zvyšují množství glutathionu a antioxidantních enzymů. Současně česnekové sloučeniny ovlivňují apoptotickou dráhu a modifikují genovou expresi prostřednictvím acetylace histonů. Česnekové sloučeniny navíc mohou sloužit jako přímý zdroj gasotransmiteru sulfanu nebo prostřednictvím aktivace enzymů zodpovědných za jeho produkci. Tímto způsobem vzniklý sulfan následně může regulovat řadu fyziologických procesů. Současné poznatky o významu česnekových sloučenin v somatických a rakovinotvorných buňkách jsme zpracovali a publikovali jako dvě review: 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: 65-72.

Chmelíková E., Němeček D., Dvořáková M., Heroutová I., Sedmíková M. (2018). Organo-sulphur garlic compounds influence viability of mammalian cells: a review. *Scientia Agriculturae Bohemica* 49, 9-16.

6 Závěr

Cíle této práce bylo zjistit, zda lze zlepšit kvalitu oocytů prostřednictvím suplementace kultivačního média oxidem uhelnatým (CO) nebo S-allyl cysteinem (SAC). Při posouzení vlivu CO na prasečí oocyty jsme se zaměřili na dvě období vývoje oocytů, meiotické zrání a stárnutí. Prokázali jsme, že dráha HO/CO je zapojena do regulace životaschopnosti stárnoucích prasečích oocytů. Imunocytochemickou metodou jsme zjistili, že se ve stárnoucích prasečích oocytech nachází obě izoformy HO (HO-1 a HO-2), přičemž v průběhu stárnutí dochází ke zvýšení množství obou izoform. Inhibice HO prostřednictvím inhibitoru zinc-protoporphyrin IX (ZnPP IX) vedla ke zvýšení podílu apoptotických oocytů a současně ke snížení podílu intaktních oocytů. V případě suplementace kultivačního média donorem CO jsme prokázali obrácený efekt, tedy zvýšení podílu intaktních oocytů a snížení podílu apoptotických oocytů. Současně jsme sledovali vliv donoru CO na aktivitu kaspázy-3 jako markeru zahájení apoptotického rozpadu. Donor CO výrazně snížil aktivitu kaspázy-3 ve stárnoucích prasečích oocytech. Na základě získaných výsledků efektu CO na stárnoucí prasečí oocyty lze o CO uvažovat jako o potenciálním suplementu kultivačního média stárnoucích oocytů, který pozitivně ovlivňuje životaschopnost prasečích oocytů.

Stejně jako ve stárnoucích, tak i v meioticky zrajících oocytech jsme prokázali přítomnost obou izoform HO. Současně jsme sledovali zastoupení mRNA a proteinů HO-1 a HO-2, kdy se množství mRNA obou izoform v průběhu meiotického zrání neměnilo. Rovněž jsme neprokázali změny v množství proteinu HO-1, ale v případě proteinu HO-2 jsme zjistili snížení jeho exprese v průběhu meiotického zrání. Vliv inhibice obou izoform HO prostřednictvím ZnPP IX jsme hodnotili na základě jaderného zrání. Vliv inhibice HO na jaderné zrání však nebyl signifikantní. Dále jsme sledovali průběh meiotického zrání u oocytů zrajících v přítomnosti donoru CO. Kultivace v přítomnosti donoru CO inhibovala meiotické zrání, kdy došlo k zastavení průběhu meiotického zrání zejména ve stádiu MI. Současně vedla kultivace s donorem CO ke snížení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). Snížení produkce ROS lze považovat jako kladný znak, na druhou stranu je však samotná inhibice meiotického zrání negativní.

Jako další potenciální suplement kultivačního média meioticky zrajících oocytů jsme hodnotili S-allyl cystein (SAC). Meiotické zrání v přítomnosti SAC neovlivnilo

průběh jaderného zrání a ani další markery hodnotící průběh meiotického zrání (aktivita MPF/MAPK, kumulární expanze). Na druhou stranu jsme pozorovali zvýšení míry rýhování u embryí vzniklých po partenogenetické aktivaci oocytů meioticky zrajících v přítomnosti SAC. Současně kultivace v přítomnosti SAC snížila produkci ROS u meioticky zrajících i partenogeneticky aktivovaných oocytů. Na základě získaných výsledků lze SAC považovat jako potenciální suplement kultivačního média, který snižuje míru oxidativního stresu a zároveň působí kladně na časný embryonální vývoj.

Na základě získaných výsledků lze říci, že suplementace kultivačního média donorem CO může zvýšit životaschopnost stárnoucích prasečích oocytů a suplementace SAC zlepšuje kvalitu meioticky zrajících prasečích oocytů a současně i následný embryonální vývoj. Pro potvrzení vlivu CO na stárnoucí oocyt by jsme se rádi zaměřili na posouzení vývojového potenciálu oocytů stárnoucích v přítomnosti CO. Současně chceme podrobněji zhodnotit vliv CO na meiotické zrání, zejména se chceme zaměřit na posouzení vlivu časově omezené doby meiotického zrání v médiu s donorem CO a zároveň vliv donoru CO v průběhu meiotického zrání na vývojový potenciál prasečích oocytů.

8 Seznam použité literatury

Acevedo, C. H., Ahmed, A. 1998. Hemeoxygenase-1 inhibits human myometrial contractility via carbon monoxide and is upregulated by progesterone during pregnancy. *Journal Of Clinical Investigation*, 101(5), 949-955.

Abeydeera, L. R. 2002. In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology*. 57 (1). 256-273.

Adhikari, D., Liu, K. 2009. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine Reviews*. 30 (5). 438 – 464.

Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A., Gupta, S. 2012. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive biology and endokrinology*. 10 (2). 10-49.

Aktan, F. 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life sciences*. 75 (6). 639-653.

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.

Alexandreaanu, I. C., Lawson, D. M. 2002. Effects of chronic administration of a heme oxygenase substrate or inhibitor on progression of the estrous cycle, pregnancy and lactation of Sprague-Dawley rats. *Life Sciences*, 72(2), 153-162.

Alexandreaanu, I. C., Lawson, D. M. 2003. Heme Oxygenase in the Rat Ovary: Immunohistochemical Localization and Possible Role in Steroidogenesis. *Experimental Biology And Medicine*, 228(1), 59-63.

Almiñana, C., Gil, M. A., Cuello, C., Caballero, I., Roca, J., Vazquez, J. M., Gomez, E., Martinez, E. A. 2008. In vitro maturation of porcine oocytes with retinoids improves embryonic development. *Reproduction, fertility and development*. 20 (4). 483-489.

Alvarez, G. M., Morado, S. A., Soto, M. P., Dalvit, G. C., Cetica, P. D. 2015. The control of reactive oxygen species influences porcine oocyte in vitro maturation. *Reproduction in Domestic Animals*. 50 (2). 200–205.

Amagase, H. 2006. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *Journal of Nutrition*. 136. 716S-725S.

Amsterdam, A., Koch, Y., Lieberman, M. E., Lindner, H. R. 1975. Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *The Journal of Cell Biology*. 67 (3). 894 – 900.

Armstrong, D. T. 2001. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*. 55 (6). 1303-1322.

Appleton, S. D., Chretien, M. L., McLaughlin, B. E., Vreman, H. J., Stevenson, D. K., Brien, J. F., Nakatsu, K., Maurice, D. H., Marks, G. S. 1999. Selective inhibition of heme oxygenase, without of nitric oxide synthase or soluble guanylyl cyclase, by metalloporphyrins at low concentrations. *Drug Metabolism & Disposition*. 27(10). 1214-1219.

Ashkenazi, H., Cao, X., Motola, S., Popliker, M., Conti, M., Tsafiriri, A. 2005. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology*. 146 (1). 77 – 84.

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.

Bainbridge, S. A., Smith, G. N. 2005. HO in pregnancy. *Free Radical Biology And Medicine*, 38(8), 979-988.

Beg, M. A., Ginther, O. J. 2006. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction*. 132 (3). 365 – 377.

Ben – Ami, I., Fremann, S., Armon, L., Dantes, A., Strassburger, D., Friedler, S., Raziel, A., Seger, R., Ron – El, R., Amsterdam, A. 2006. PGE2 up – regulates EGF – like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: new insights into the coordination between PGE2 and LH in ovulation. *Molecular Human Reproduction*. 12 (10). 593 – 599.

Bergandi, L., Basso, G., Evangelista, F., Canosa, S., Dalmasso, P., Aldieri, E. 2014. Inducible Nitric Oxide Synthase and Heme Oxygenase 1 Are Expressed in Human Cumulus Cells and May Be Used as Biomarkers of Oocyte Competence. *Reproductive Sciences*, 21(11), 1370-1377.

Bergeron, L., Perez, G. I., Macdonald, G., Shi, L., Sun, Y., Jurisicova, A., Varmuza, S., Latham, K. E., Flaws, J. A., Salter, J. C., Hara, H., Moskowitz, M. A., Li, E., Greenberg, A., Tilly, J. L., Yuan, J. 1998. Defects in regulation of apoptosis in caspase – 2 – deficient mice. *Genes and Development*. 12 (9). 1304 – 1314.

Bielanska – Osuchowska, Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology*. 6 (2). 161 – 193.

Bilban, M., Bach, F. H., Otterbein, S. L., Ifedigbo, E., de Costa d'Avila, J., Esterbauer, H., et al. 2006. Carbon Monoxide Orchestrates a Protective Response through PPAR γ . *Immunity*, 24(5), 601-610.

Bilban, M., Haschemi, A., Wegiel, B., Chin, B. Y., Wagner, O., Otterbein, L. E. 2008. Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling. *Journal Of Molecular Medicine*, 86(3), 267-279.

Biswas, C., Shah, N., Muthu, M., La, P., Fernando, A. P., Sengupta, S., et al. 2014. Nuclear Heme Oxygenase-1 (HO-1) Modulates Subcellular Distribution and Activation of Nrf2, Impacting Metabolic and Anti-oxidant Defenses. *Journal Of Biological Chemistry*, 289(39), 26882-26894.

Black, J. L., Erickson, B. H. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Records*. 161(1). 45-55.

Blandau, R. J. 1952. The female factor in fertility and infertility. I. Effects of delayed fertilization on the development of the pronuclei in rat ova. *Fertility and Sterility*. 3 (5). 349-365.

Blondin, P., Coenen, K., Guilbault, L. A., Sirard, M. A. 1996. Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. 46 (7). 1191-1203.

Brouard, S., Otterbein, L. E., Anrather, J., Tobiasch, E., Bach, F. H., Choi, A. M. K., Soares, M. P. 2000. Carbon Monoxide Generated by Heme Oxygenase 1 Suppresses Endothelial Cell Apoptosis. *The Journal Of Experimental Medicine*, 192(7), 1015-1026.

Boczkowski, J., Poderoso, J. J., Motterlini, R. 2006. CO-metal interaction: vital signaling from a lethal gas. *Trends In Biochemical Sciences*, 31(11), 614-621.

Bornslaeger, E. A., Wilde, M. W., Schultz, R. M. 1984. Regulation of mouse oocyte maturation: involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmodulin. *Developmental Biology*. 105(2). 488-499.

Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M. J., Rossant, J., Hamada, H., Koopman, P. 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science*. 312 (5773). 596 – 600.

Bu, S., Xia, G., Tao, Y., Lei, L., Zhou, B. 2003. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 207 (1-2). 21-30.

Buccione, R., Vanderhyden, B. C., Caron, P. J., Eppig, J. J. 1990. FSH induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factors secreted by the oocyte. *Developmental Biology*. 138 (1). 16 – 25.

Buonomo, S. B., Clyne, R. K., Fuchs, J., Loidl, J., Uhlmann, F., Nasmyth, K. 2000. Disjunction of homologous chromosomes in meiosis depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell*. 103 (3). 387 – 398.

Buszczak, M., Cooley, L. 2000. Eggs to die for: cell death during *Drosophila* oogenesis. *Cell Death and Differentiation*. 7 (11). 1071 – 1074.

Cella, M., Farina, M. G., Keller Sarmiento, M. I., Chianelli, M., Rosenstein, R. E., Franchi, A. M. 2006. Heme oxygenase–carbon monoxide (HO–CO) system in rat uterus: Effect of sexual steroids and prostaglandins. *The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology*, 99(1), 59-66.

Cervantes, M. I., de Oca Balderas, P. M., de Jesus Gutierrez-Banos, J., Orozco-Ibarra, M., Fernandez-Rojas, B., Medina-Campos, O. N., Espinoza-Rojo, M., Ruiz-Tachiquin, M., Ortiz-Plata, A., Salazar, M. I., Rubio-Osornio, M., Castañeda-Saucedo, E., Pedraza-Chaverri, J., Calzada, F., Aguilera, P. 2013. Comparison of antioxidant activity of hydroethanolic fresh and aged garlic extracts and their effects on cerebral ischemia. *Food Chemistry*. 140 (1-2). 343-52.

Cepinskas, G., Katada, K., Bihari, A., Potter, R. F. 2007. Carbon monoxide liberated from carbon monoxide-releasing molecule CORM-2 attenuates inflammation in the liver of septic mice. *The American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*. 294(1). G184-G191.

Cruz, C., Correa-Rotter, R., Sánchez-González, D. J., Hernández-Pando, R., Maldonado, P. D., Martínez-Martínez, C. M., Medina-Campos, O. N., Tapia, E., Aguilar, D., Chirino, Y., Pedraza-Chaverri, J. 2007. Renoprotective and antihypertensive effects of S-allylcysteine in 5/6 nephrectomized rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 293 (5). F1691-8.

Cohen P. E., Holloway J. K., 2015. Mammalian meiosis. In: Plant T. M., Zeleznik A. J. (Eds.). *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*. 4th. Academic Press. p. 5-57.

Colín-González, A. L., Santana, R. A., Silva-Islas C. A., Chánez-Cárdenas, M. E., Santamaría, A., Maldonado, P. D. 2012. The Antioxidant Mechanisms Underlying the Aged Garlic Extract- and S-Allylcysteine-Induced Protection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 17. 907162

Corzo-Martinez, M., Corzo, N., Villamiel, M. 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Science and Technology*. 18. 609–625.

Corrêa, G. A., Rumpf, R., Mundim, T. C., Franco, M. M., Dode, M. A. 2008. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Animal Reproduction Science*. 104 (2-4). 132-142.

Cudmore, M., Ahmad, S., Al-Ani, B., Fujisawa, T., Coxall, H., Chudasama, K. 2007. Negative Regulation of Soluble Flt-1 and Soluble Endoglin Release by Heme Oxygenase-1. *Circulation*, 115(13), 1789-1797.

Coy, P., Romar, R. 2002. In vitro production of pig embryos: a point of view. *Reproduction, fertility and development*. 14 (5-6). 275-286.

D'Amico, G., Lam, F., Hagen, T., Moncada, S. 2006. Inhibition of cellular respiration by endogenously produced carbon monoxide. *Journal Of Cell Science*, 119(11), 2291-2298.

Dieci, C., Lodde, V., Franciosi, F., Lagutina, I., Tessaro, I., Modina, S. C., Albertini, D. F., Lazzari, G., Galli, C., Luciano, A. M. 2013. The effect of cilostamide on gap junction communication dynamics, chromatin remodeling, and competence acquisition in pig oocytes following parthenogenetic activation and nuclear transfer. *Biology of reproduction*. 89 (3). 68.

Ding, B., Gibbs, P. E. M., Brookes, P. S., Maines, M. D. 2011. The coordinated increased expression of biliverdin reductase and heme oxygenase-2 promotes cardiomyocyte survival: a reductase-based peptide counters β -adrenergic receptor ligand-mediated cardiac dysfunction. *The FASEB Journal*. 25(1). 301-313.

Delaby, C., Pilard, N., Puy, H., Canonne-Hergaux, F. 2008. Sequential regulation of ferroportin expression after erythrophagocytosis in murine macrophages: early mRNA induction by haem, followed by iron-dependent protein expression. *Biochemical Journal*, 411(1), 123-131.

Demirkaya, E., Avci, A., Kesik, V., Karslioglu, Y., Oztas, E., Kismet, E., Gokcay, E., Durak, I., Koseoglu, V. 2009. Cardioprotective roles of aged garlic extract, grape seed proanthocyanidin, and hazelnut on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 87 (8). 633–640.

Dennery, P. A. 2014. Signaling Function of Heme Oxygenase Proteins. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(11), 1743-1753.

Dennerly, P. A., McDonagh, A. F., Spitz, D. R., Rodgers, P. A., Stevenson, D. K. 1995. Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Radical Biology And Medicine*, 19(4), 395-404.

Devoto, L., Vega, M., Kohen, P., Castro, O., Carvallo, P., Palomino, A. 2002. Molecular regulation of progesterone secretion by the human corpus luteum throughout the menstrual cycle. *Journal Of Reproductive Immunology*, 55(1-2), 11-20.

Domenico, R. 2004. Pharmacology of nitric oxide: Molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Current pharmaceutical design*. 10 (14). 1667-1676.

Donovan P. J., Stott D., Cairns L. A., Heasman J., Wylie C. C. 1986. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell*. 44. 831-838.

Downs, S. M., Daniel, S. A., Bornslaeger, E. A., Hoppe, P. C., Eppig, J. J. 1989. Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. *Gamete Research*. 23 (3). 323 – 334.

Driancourt, M. A. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*. 35 (1). 55 – 68.

Driancourt, M. A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55 (6). 1211 – 1239.

Dodson, M. G., Minhas, B. S., Curtis, S. K., Palmer, T. V., Robertson, J. L. 1989. Spontaneous zona reaction in the mouse as a limiting factor for the time in which an oocyte may be fertilized. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. 6. 101–106.

Dunn, L. L., Midwinter, R. G., Ni, J., Hamid, H. A., Parish, C. R., Stocker, R. 2014. New Insights into Intracellular Locations and Functions of Heme Oxygenase-1. *Antioxidants*, 20(11), 1723-1742.

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.

Eichenlaub – Ritter, U. 2012. Oocyte aging and its cellular basis. *The International Journal of Developmental Biology*. 56 (10 – 12). 841 – 852.

Eichenlaub – Ritter, U., Peschke, M. 2002. Expression in *in vivo* and *in vitro* growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Human Reproduction Update*. 8 (1). 21 – 41.

Eppig, J. J. 1989. The participation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in the regulation of meiotic maturation of oocytes in the laboratory mouse. *Journal of reproduction and fertility*. 38. 3–8.

Eppig, J. J. 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reproduction, Fertility and Development*. 8(4). 485-489.

Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*. 78 (3). 203 – 216.

Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., Navarro, P. A. A. S. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 71, 836–848.

Ferrell, J. Jr., Wu, M., Gerhart, J. C., Martin, G. S. 1991. Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule – associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Molecular and Cellular Biology*. 11 (4). 1965 – 1971.

Findlay, J. K., Drummond, A. E., Britt, K. L., Dyson, M., Wreford, N. G., Robertson, D. M., Groome, N. P., Jones, M. E., Simpson, E. R. 2000. The roles of activins, inhibins and estrogen in early committed follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 163 (2). 81 – 87.

Finkel, T. 1998. Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion In Cell Biology*, 10(2), 248-253.

Fujino, Y., Ozaki, K., Yamamasu, S., Ito, F., Matsuoka, I., Hayashi, E., Nakamura, H., Ogita, S., Sato, E., Inoue, M. 1996. DNA fragmentation of oocytes in aged mice. *Human Reproduction*. 11 (7). 1480-1483.

Funahashi, H., Day, B. N. 1993. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *Journal of reproduction and fertility*. 98 (1). 179-185.

Funahashi, H., Cantley, T. C., Stumpf, T. T., Terlouw, S. L., Day, B. N. 1994. In vitro development of in vitro-matured porcine oocytes following chemical activation or in vitro fertilization. *Biology of reproduction*. 50 (5). 1072-1077.

Funahashi, H., Cantley, T. C., Day, B. N. 1997. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. *Biology of reproduction*. 57 (1). 49-53.

Furchgott, R. F., Jothianandan, D. 1991. Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: Relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels*, 28(1), 52-61.

Gende, O. A. 2004. Carbon monoxide inhibits capacitative calcium entry in human platelets. *Thrombosis Research*. 114(2). 113-119.

George, E. M., Granger, J. P. 2013. Heme oxygenase in pregnancy and preeclampsia. *Current Opinion In Nephrology And Hypertension*, 22(2), 156-162.

Gil, M. A., Cuello, C., Parrilla, I., Vazquez, J. M., Roca, J., Martinez, E. A. 2010. Advances in swine in vitro embryo production technologies. *Reproduction in domestic animals*. 45 (2). 40-48.

Gilchrist, R. B., Thompson, J. G. 2007. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology*. 67(1). 6–15.

Grasselli, F., Ponderato, N., Basini, G., Tamanini, C. 2001. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide/cyclic GMP pathway in swine granulosa cells. *Domestic Animal Endocrinology*, 20(4), 241-252.

Greenfeeld, C. R., Pepling, M. E., Babus, J. K., Furth, P. A., Flaws, J. A. 2007. BAX regulates follicular endowment in mice. *Reproduction*. 133 (5). 865 – 876.

Grundemar, L., Ny, L. 1997. Pitfalls using metalloporphyrins in carbon monoxide research. *Trends in Pharmacological Sciences*. 18(6). 193-195.

Gruppen, C. G., Nahashima, H., Nottle, M. B. 1995. cysteamine enhance in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Biology of reproduction*. 53. 173-178.

Gordo, A. C., He, C. L., Smith, S., Fissore, R. A. 2001. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 59 (1). 106 – 114.

Gordo, A. C., Rodrigues, P., Kurokawa, M., Jellerette, T., Exley, G. E., Warner, C., Fissore, R. A. 2002. Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation in in vitro aged mouse eggs. *Biology of Reproduction*. 66 (2). 1828–1837.

Guthrie, H. D., Grimes, R. W., Cooper, B. S., Hammond, J. M. 1995. Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. *Journal of Animal Science*. 73 (9). 2834 – 2844.

Han, S. J., Conti, M. 2006. New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate. *Cell Cycle*. 5 (3). 227 – 231.

Han, S. J., Chen, R., Paronetto, M. P., Conti, M. 2005. Wee1B is an oocyte – specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. *Current Biology*. 15 (18). 1670 – 1676.

Harada, T., Koi, H., Kubota, T., Aso, T. 2004. Haem oxygenase augments porcine granulosa cell apoptosis in vitro. *Journal Of Endocrinology*, 181(1), 191-205.

Hatta, K., Carter, A. L., Chen, Z., Leno-Duran, E., Ruiz-Ruiz, C., Olivares, E. G. 2011. Expression of the Vasoactive Proteins AT1, AT2, and ANP by Pregnancy-Induced Mouse Uterine Natural Killer Cells. *Reproductive Sciences*, 18(4), 383-390.

Hattori, M., Tabata, S. 2006. Nitric oxide and ovarian function. *Animal science journal*. 77 (3). 275-284.

Hayashi, S., Omata, Y., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., Hara, T., Sagara, Y., Noguchi, M. 2004. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene*, 336(2), 241-250.

Hillier, S. G., Whitelaw, P. F., Smyth, C. D. 1994. Follicular oestrogen synthesis: the two – cell, two – gonadotrophin model revisited. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 100 (1). 51 – 54.

Hirai, K., Sasahira, T., Ohmori, H., Fuji, K., Kuniyasu, H. 2007. Inhibition of heme oxygenase-1 by zinc protoporphyrin IX reduces tumor growth of LL/2 lung cancer in C57BL mice. *International Journal of Cancer*. 120(3). 500-505.

Hirao, Y., Nagai, T., Kubo, M., Miyano, T., Miyaki, M., Kato, S. 1994. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 100 (2). 333 – 339.

Hirshfield, A. N. 1991. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biology of Reproduction*. 44 (6). 1157 – 1162.

Holt, J. E., Lane, S. I. R., Jones, K. T. 2013. The control of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Current Topics in Developmental Biology*. 102. 207 – 226.

Homa, S. T. 1995. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Molecular Reproduction and Development*. 40 (1). 122 – 134.

Horner, K., Livera, G., Hinckley, M., Trinh, K., Storm, D., Conti, M. 2003. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Developmental Biology*. 258 (3). 385–96.

Hori, R., Kashiba, M., Toma, T., Yachie, A., Goda, N., Makino, N., et al. 2002. Gene Transfection of H25A Mutant Heme Oxygenase-1 Protects Cells against Hydroperoxide-induced Cytotoxicity. *Journal Of Biological Chemistry*, 277(12), 10712-10718.

Hoyt, M. A. 2001. A new view of the spindle checkpoint. *The Journal of Cell Biology*. 154 (5). 909 – 911.

Hsieh, M., Lee, D., Panigone, S., Horner, K., Chen, R., Theologis, A., Lee, D. C., Threadgill, D. W., Conti, M. 2007. Luteinizing hormone – dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Molecular and Cellular Biology*. 27 (5). 1914 – 1924.

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.

Huang, X., Tong, J. S., Wang, Z. B., Yang, C. R., Qi, S. T., Guo, L., Ouyang, Y. C., Quan, S., Sun, Q. Y., Qi, Z. Q., Huang, R. X., Wang, H. L. 2011. JNK2 participates in spindle assembly during mouse oocyte meiotic maturation. *Microscopy and Microanalysis*. 17 (2). 197-205.

Hunter, M. G. 2000. oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5 (2). 122 – 130.

Hurk, R., Zhao, J. 2004. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63 (6). 1717 – 1751.

Chaube, S. K., Khatun, S., Misra, S. K., Shrivastav, T. G. 2008. Calcium ionophore-induced egg activation and apoptosis are associated with the generation of intracellular hydrogen peroxide. *Free Radical Research*. 42 (3). 212-220.

Chaube, S. K., Shrivastav, T. G., Tiwari, M., Prasad, S., Tripathi, A., Pandey, A. K. 2014. Neem (*Azadirachta indica* L.) leaf extract deteriorates oocyte quality by inducing ROS-mediated apoptosis in mammals. *Springerplus*. 26 (3). 464-471.

Chen, L., Wert, S. E., Hendrix, E. M., Russell, P. T., Cannon, M., Larsen, W. J. 1990. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Molecular Reproduction and Development*. 26(3). 236-47.

Chen, B., Guo, L., Fan, C., Bolisetty, S., Joseph, R., Wright, M. M., et al. 2009. Carbon Monoxide Rescues Heme Oxygenase-1-Deficient Mice from Arterial

Thrombosis in Allogeneic Aortic Transplantation. *The American Journal Of Pathology*, 175(1), 422-429.

Chesnel, F., Eppig, J. J. 1995. Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. *Molecular Reproduction and Development*. 40 (4). 503 – 508.

Chi, M., Manchester, J. K., Yang, V. C., Curato, A. D., Strickler, R. C., Lowry, O. H. 1988. Contrast in levels of metabolic enzymes in human and mouse ova. *Biology of Reproduction*. 39 (2). 295–307.

Chirino, Y. I., Orozco-Ibarra, M., Pedraza-Chaverr, J. 2006. Role of peroxynitrite anion in different diseases. *Revista de Investigacion Clinica*. 58 (4). 350–358.

Choi, W. J., Banerjee, J., Falcone, T., Bena, J., Agarwal, A., Sharma, R. K. 2007. Oxidative stress and tumor necrosis factor-alpha-induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. *Fertility and sterility*. 88 (4). 1220-1231.

Choe, C., Shin, Y. W., Kim, E. J., Cho, S. R., Kim, H. J., Choi, S. H., Han, M. H., Han, J., Son, D. S., Kang, D. 2010. Synergistic effects of glutathione and β -mercaptoethanol treatment during in vitro maturation of porcine oocytes on early embryonic development in a culture system supplemented with L-cysteine. *Journal of reproduction and development*. 56 (6). 575-582.

Chuah, S. C., Moore, P. K., Zhu, Y. Z. 2007. S-allylcysteine mediates cardioprotection in an acute myocardial infarction rat model via a hydrogen sulfide-mediated pathway. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 293 (3). H2693–H2701.

Chung, L. Y. 2006. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. *Journal of Medicinal Food*. 9 (2). 205–213.

Ide, N., Lau, B. H. S. 1999. S-Allylcysteine attenuates oxidative stress in endothelial cells. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 25 (5). 619–624.

Igarashi, H., Takahashi, E., Hiroi, M., Doi, K. 1997. Aging related changes in calcium oscillations in fertilized mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 48. 383–390.

Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M., Wood, K. S. 1987. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation Research*, 61(6), 866-879.

Ihara, N., Akagi, R., Ejiri, K., Kudo, T., Furuyama, K., Fujita, H. 1998. Developmental changes of gene expression in heme metabolic enzymes in rat placenta. *Febs Letters*, 439(1-2), 163-167.

Imai, J., Ide, N., Nagae, S., Moriguchi, T., Matsuura, H., Itakura, Y. 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Medica*. 60 (5). 417–420.

Ingi, T., Cheng, J., Ronnett, G. V. 1996. Carbon Monoxide: An Endogenous Modulator of the Nitric Oxide–Cyclic GMP Signaling System. *Neuron*, 16(4), 835-842.

Inoue, D., Ohe, M., Kanemori, Y., Nobui, T., Sagata, N. 2007. A direct link of the Mos – MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of *Xenopus laevis* eggs. *Nature*. 446 (7139). 1100 – 1104.

Ito, J., Kashiwazaki, N. 2012. Molecular mechanism of fertilization in the pig. *Animal Science Journal*. 83 (10). 669 – 682.

Ishimaru, R., Leung, K., Hong, L., LaPolt, P. S. 2001. Inhibitory effects of nitric oxide on estrogen production and cAMP levels in rat granulosa cell cultures. *Journal Of Endocrinology*, 168(2), 249-255.

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.

Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Yamamoto, T. M., Sawada, W., Kishimoto, T. 2000. Residual Cdc2 activity remaining at meiosis exit is essential for meiotic M – M transition in *Xenopus* oocyte extracts. *The EMBO Journals*. 19 (17). 4513 – 4523.

Jeppesen, J. V., Kristensen, S. G., Nielsen, M. E., Humaidan, P., Dal Canto, M., Fadini, R., Schmidt, K. T., Ernst, E., Yding Andersen C. 2012. LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 97(8). E1524–31.

Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., Tilly, J. L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428 (6979). 145 – 150.

Jones, K. T. 2011. Anaphase – promoting complex control in female mouse meiosis. *Results and Problems in Cell Differentiation*. 53. 343 – 363.

Kalayarasan, S., Sriram, N., Sureshkumar, A., Sudhandiran, G. 2008. Chromium (VI)-induced oxidative stress and apoptosis is reduced by garlic and its

derivative S-allylcysteine through the activation of Nrf2 in the hepatocytes of wistar rats. *Journal of Applied Toxicology*. 28 (7). 908–919.

Kamoun, P. 2004. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino acids*. 26 (3). 243-254.

Kastrop, P. M., Hulshof, S. C., Bevers, M. M., Destrée, O. H., Kruij, T. A. 1991. The effects of alpha-amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and phosphorylation during bovine oocyte maturation in vitro. *Molecular reproduction and development*. 28 (3). 249-254.

Kawamura, K., Ye, Y., Liang, C. G., Kawamura, N., Gelpke, N. S., Rauch, R., Tanaka, T., Hsueh, A. J. 2009. Paracrine regulation of the resumption of oocyte meiosis by endothelin – 1. *Developmental Biology*. 327 (1). 62 – 70.

Kawamura, K., Cheng, Y., Kawamura, N., Takae, S., Okada, A., Kawagoe, Y., Mulders, S., Terada, Y., Hsueh, A. J. 2011. Pre – ovulatory LH/hCG surge decreases C – type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of the pre – ovulatory oocytes. *Human Reproduction*. 26 (11). 3094 – 3101.

Khazaei, M., Aghaz, F. 2017. Reactive Oxygen Species Generation and Use of Antioxidants during In Vitro Maturation of Oocytes. *International journal of fertility and sterility*. 11 (2). 63-70.

Kikuchi, K., Izaike, Y., Noguchi, J., Furukawa, T., Daen, F. P., Naito, K., Toyoda, Y. 1995. Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 105 (2). 325-330.

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.

Kim, H. P., Ryter, S. W., Choi, A. M. K. 2006. CO as a cellular signaling molecule. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology*, 46(1), 411-449.

Kim, J. M., Lee, J. C., Chang, N., Chun, H. S., Kim, W. K. 2006. S-Allyl-l-cysteine attenuates cerebral ischemic injury by scavenging peroxynitrite and inhibiting the activity of extracellular signal-regulated kinase. *Free Radical Research*. 40 (8). 827–835.

Kim, H. S., Loughran, P. A., Billiar, T. R. 2008. Carbon monoxide decreases the level of iNOS protein and active dimer in IL-1 β -stimulated hepatocytes. *Nitric Oxide*, 18(4), 256-265.

Kim, Y. M., Pae, H. O., Park, J. E., Lee, Y. C., Woo, J. M., Kim, N. H. 2011. Heme Oxygenase in the Regulation of Vascular Biology: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(1), 137-167.

Kimura, H. 2015. Signaling Molecules: Hydrogen Sulfide and Polysulfide. *Antioxidants & Redox Signaling*. 22 (5). 362-376.

Knox, R. V., Vatzias, G., Naber, C. H., Zimmermann, D. R. 2003. Plasma gonadotropins and ovarian hormones during the estrous cycle in high compared to low ovulation rate gilts. *Journal of Animal Science*. 81 (1). 249 – 260.

Kramer, E. R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., Peters, J. M. 2000. Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Molecular Biology of the Cell*. 11 (5). 1555 – 1569.

Kreiser, D., Nguyen, X., Wong, R., Seidman, D., Stevenson, D., Quan, S., et al. 2002. Heme Oxygenase-1 Modulates Fetal Growth in the Rat. *Laboratory Investigation*, 82(6), 687-692.

Kreiser, D., Kelly, D. K., Seidman, D. S., Stevenson, D. K., Baum, M., Dennery, P. A. 2003. Gestational Pattern of Heme Oxygenase Expression in the Rat. *Pediatric Research*, 54(2), 172-178.

Krejčová, T., Šmelcová, M., Petr, J., Bodart, J. F., Sedmíková, M., Nevorál, 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). e0116964.

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.

Kovo, M., Kandli – Cohen, M., Ben – Haim, M., Galiani, D., Carr, D. W., Dekel, N. 2006. An active protein kinase A (PKA) is involved in meiotic arrest of rat growing oocytes. *Reproduction*. 132 (1). 33 – 43.

Kudo, N. R., Anger, M., Peters, A. H., Stemmann, O., Theussl, H. C., Helmhart, W., Kudo, H., Heyting, C., Nasmyth, K. 2009. Role of cleavage by separate of the Rec8 kleisin subunit of cohesin during mammalian meiosis □. *Journal of Cell Science*. 122 (15). 2686 – 2698.

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.

Lawal, A. O., Ellis, E. M. 2011. The chemopreventive effects of aged garlic extract against cadmium-induced toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 32 (2). 266–274.

Lee, P. S., Buchan, A. M., Hsueh, A. J., Yuen, B. H., Leung, P. C. 2001. Intracellular calcium mobilization in response to the activation of human wild – type and chimeric gonadotropin receptors. *Endocrinology*. 143 (5). 1732 – 1740.

Lévesque, J. T., Sirard, M. A. 1994. Proteins in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their development capacity. *Reproduction, nutrition, development*. 34 (2). 133-139.

Levytska, K., Kingdom, J., Baczyk, D., Drewlo, S. 2013. Heme oxygenase-1 in placental development and pathology. *Placenta*, 34(4), 291-298.

Li, Y. H., Liu, R. H., Jiao, L. H., Wang, W. H. 2002. Synergetic effects of epidermal growth factor and estradiol on cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Zygote*. 10 (4). 349-354.

Li, L., Tang, J., Sun, Y., Wu, J., Yu, P., Wang, G. 2015. Upregulation of HO-1 Attenuates LPS-Stimulated Proinflammatory Responses Through Downregulation of p38 Signaling Pathways in Rat Ovary. *Inflammation*, 38(3), 1085-1092.

Li, C., Zhang, C., Wang, T., Xuan, J., Su, C., Wang, Y. 2016. Heme oxygenase 1 induction protects myocardiac cells against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis. *Herz* 41(8). 715-724.

Liang, X. W., Zhu, J. Q., Miao, Y. L., Liu, J. H., Wei, L., Lu, S. S., Hou, Y., Schatten, H., Lu, K. H., Sun, Q. Y. 2008. Loss of methylation imprint of Snrpn in postovulatory aging mouse oocyte. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 371 (1). 16-21.

Liang, X. W., Ge, Z. I., Wei, L., Guo, L., Han, Z. M., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2011. The effects of postovulatory aging of mouse oocytes on methylation and expression of imprinted genes at mid-term gestation. *Molecular Human Reproduction*. 17. 562–567.

Lim, H., Paria, B. C., Das, S. K., Dinchuk, J. E., Langenbach, R., Trzaskos, J. M., Dey, S. K. 1997. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2 deficient mice. *Cell*. 91 (2). 197 – 208.

Lim, I., Gibbons, S. J., Lyford, G. L., Miller, S. M., Strege, P. R., Sarr, M. G., Chatterjee, S., Szurszewski, J. H., Shah, V. H., Farrugia, G. 2005. Carbon monoxide activates human intestinal smooth muscle L-type Ca²⁺ channels through a nitric oxide

dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 288(1). G7-G14.

Lin, H., McGrath, J. J. 1988. Carbon monoxide effects on calcium levels in vascular smooth muscle. *Life Sciences*. 43(22). 1813-1816.

Lincoln, A. J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R. M., Palko, M. E., De Miguel, M. P., Tessarollo, L., Donovan, P. J. 2002. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nature Genetics*. 30 (4). 446 – 449.

Liu, N., Wang, X., McCoubrey, W. K., Maines, M. D. 2000. Developmentally regulated expression of two transcripts for heme oxygenase-2 with a first exon unique to rat testis: control by corticosterone of the oxygenase protein expression. *Gene*, 241(1), 175-183.

Liu, H., Wang, T., Huang, K. 2009a. Cholestane-3B, 5a, 6B-triol-induced reactive oxygen species production promotes mitochondrial dysfunction in isolated mice liver mitochondria. *Chemico-Biological Interaction*. 15. 81-87.

Liu, N., Wu, Y., Lan, G., Sui, H., Ge, L., Wang, J., Liu, Y., Qiao, T., Tan. J. 2009b. Pyruvate prevents aging of mouse oocytes. *Reproduction*. 138. 223–234.

Linzke, N., Schumacher, A., Woidacki, K., Croy, B. A., Zenclussen, A. C. 2014. Carbon Monoxide Promotes Proliferation of Uterine Natural Killer Cells and Remodeling of Spiral Arteries in Pregnant Hypertensive Heme Oxygenase-1 Mutant Mice. *Hypertension*, 63(3), 580-588.

Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., Dulak, J. 2016. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and molecular life sciences*. 73 (17). 3221-3247.

Lorca, T., Castro, A. 2010. Mechanism controlling maintenance and exit of the CSF arrest. In: Verlhac, M. H., Villeneuve, A. (eds.). *Oogenesis: The universal process*. Wiley – Blackwell. Chippenham. p. 343 – 355. ISBN: 978-0-470-69682-8.

Lorca, T., Cruzalegui, F. H., Fesquet, D., Cavadore, J. C., Mery, J., Means, A., Dorée, M. 1993. Calmodulin – dependent protein kinase mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*. 366 (6452). 270 – 273.

Lorca, R. A., Prabakaran, M., England, S. K. 2014. Functional insights into modulation of BKCa channel activity to alter myometrial contractility. *Frontiers In Physiology*, 5,

Lord, T., Aitken, R. J. 2013. Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction*. 146 (6). 217-227.

Lord, T., Nixon, B., Jones, K. T., Aitken, R. J. 2013. Melatonin prevents postovulatory oocyte aging in the mouse and extends the window for optimal fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*. 88 (3). 1–9.

Lucy, M. C., Liu, J., Boyd, C. K., Bracken, C. J. 2001. Ovarian follicular growth in sows. *Reproduction Supplement*. 58. 31 – 45.

Luo, D., Vincent, S. R. 1994. Metalloporphyrins inhibit nitric oxide-dependent cGMP formation in vivo. *European Journal of Pharmacology. Molecular Pharmacology*. 267(3). 263-267.

Ma, N., Ding, X., Doi, M., Izumi, N., Semba, R. 2004. Cellular and subcellular localization of heme oxygenase-2 in monkey retina. *Journal Of Neurocytology*, 33(4), 407-415.

Maedomari, N., Kikuchi, K., Ozawa, M., Noguchi, J., Kaneko, H., Ohnuma, K., Nakai, M., Shino, M., Nagai, T., Kashiwazaki, N. 2007. Cytoplasmic glutathione regulated by cumulus cells during porcine oocyte maturation affects fertilization and embryonic development in vitro. *Theriogenology*. 67 (5). 983-993.

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. 1206–1210.

Maines, M. D. 1997. The heme oxygenase system: A Regulator of Second Messenger Gases. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology*, 37(1), 517-554.

Maines, M. D., Kutty, R. K. 1991. Differential response of testicular and ovarian heme oxygenase activity to metal ions. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 226(1), 134-144.

Maines, M. D., Trakshel, G. M., Kutty, R. K. 1986. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *The Journal Of Biological Chemistry*, 261(1), 411-419.

Majewski, M. 2014. *Allium sativum*: facts and myths regarding human health. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 65. 1–8.

Maldonado, P. D., Alvarez-Idaboy, J. R., Aguilar-González, A., Lira-Rocha, A., Jung-Cook, H., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverrí, J., Galano, A. 2011. Role

of allyl group in the hydroxyl and peroxy radical scavenging activity of s-allylcysteine. *The Journal of Physical Chemistry B*. 115 (45). 13408–13417.

McGee, E. A., Hsueh, A. J. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrinology Review*. 21 (2). 200 – 214.

Medina-Campos, O. N., Barrera, D., Segoviano-Murillo, S., Rocha, D., Maldonado, P. D., Mendoza-Patiño, N., Pedraza-Chaverri, J. 2007. S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK1 cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 45 (10). 2030–2039.

Meduri, G., Charnaux, N., Driancourt, M. A., Combettes, L., Granet, P., Vannier, B., Loosfelt, H., Milgrom, E. 2002. Follicle – stimulating hormone receptors in oocytes? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 87 (5). 2266 – 2276.

Mehlmann, L. M., Terasaki, M., Jaffe, L. A., Kline, D. 1995. Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology*. 170 (2). 607 – 615.

Miao, Y. L., Kikuchi, K., Sun, Q. Y., Schatten, H. 2009. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum Reproduction Update*. 15 (5). 573-585.

Miyagaki, Y., Kanemori, Y., Tanaka, F., Baba, T. 2014. Possible Role of p38 MAPK-MNK1-EMI2 Cascade in Metaphase-II Arrest of Mouse Oocytes. *Biology Of Reproduction*, 91(2), 45-45.

McCoubrey, W. K., Maines, M. D. 1993. Domains of Rat Heme Oxygenase-2: The Amino Terminus and Histidine 151 Are Required for Heme Oxidation. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 302(2), 402-408.

Morbeck, D. E., Esbenshade, K. L., Flowers, W. L., Britt, J. H. 1992. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biology of Reproduction*. 47 (3). 485 – 491.

Morse, D., Pischke, S. E., Zhou, Z., Davis, R. J., Flavell, R. A., Loop, T., Otterbein, S. L., Otterbein, L. E., Choi, A. M. 2003. Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. *Journal of Biological Chemistry*. 278(39). 36993-36998.

Moor, R. M., Mattioli, M., Ding, J., Nagai, T. 1990. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of reproduction and fertility*. 40. 197-210.

Motlík, J., Fulka, J. 1974. Fertilization of pig follicular oocytes cultivated in vitro. *Journal of reproduction and fertility*. 36 (1). 235-237.

Motlik, J., Fulka, J. 1976. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *The journal of experimental zoology*. 198 (2). 155-162.

Motterlini, R., Green, C. J., Foresti, R. 2002. Regulation of Heme Oxygenase-1 by Redox Signals Involving Nitric Oxide. *Antioxidants & Redox Signaling*, 4(4), 615-624.

Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A., Dunphy, W. G. 1995. Myt1: a membrane – associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine – 14 and tyrosine – 15. *Science*. 270 (5233). 86 – 90.

Muñoz-Sánchez, J., Chánez-Cárdenas, M. E. 2014. A Review on Hemeoxygenase-2: Focus on Cellular Protection and Oxygen Response. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2014, 1-16.

Murphy, B. j., Laderoute, K. R., Short, S. M., Sutherland, R. M. 1991. The identification of heme oxygenase as a major hypoxic stress protein in Chinese hamster ovary cells. *British Journal Of Cancer*, 64(1), 69-73.

Nasmyth, K. 2001. Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annual Review of Genetics*. 35. 673 – 745.

Nagashima, H., Grupen, C. G., Ashman, R. J., Nottle, M. B. 1996. Developmental competence of in vivo and in vitro matured porcine oocytes after subzonal sperm injection. *Molecular reproduction and development*. 45 (3). 359-363.

Nakai, M., Ozawa, M., Maedomari, N., Noguchi, J., Kaneko, H., Ito, J., Onishi, A., Kashiwazaki, N., Kikuchi, K. 2014. Delay in Cleavage of Porcine Embryos after Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) Shows Poorer Embryonic Development. *Journal of reproduction and development*. 60 (3). 256-259.

Nebreda, A. R., Hunt, T. 1993. The c – mos proto – oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell – free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *The EMBO Journals*. 12 (5). 1979 – 1986.

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). e99613.

Nishiyama, T., Tachibana, K., Kishimoto, T. 2010. Cytostatic arrest: post – ovulation arrest until fertilization in metazoan oocytes. In: Verlhac, M. H., Villeneuve,

A. (eds.). *Oogenesis: The universal process*. Wiley – Blackwell. Chippenham. p. 357 – 384. ISBN: 978- 0-470-69682-8.

Nixon, V. L., Levasseur, M., McDougall, A., Jones, K. T. 2002. Ca oscillations promote APC/C-dependent cyclin B1 degradation during metaphase arrest and completion of meiosis in fertilizing mouse eggs. *Current Biology*. 12 (4). 746–750.

Nogueira, D., Cortvrindt, R., De Matos, D. G., Vanhoutte, L., Smits, J. 2003. Effect of Phosphodiesterase Type 3 Inhibitor on Developmental Competence of Immature Mouse Oocytes In Vitro. *Biology Of Reproduction*, 69(6), 2045-2052.

Norris, R. P., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Cowan, A. E., Simon, A. M., Paul, D. L., Lampe, P. D., Jaffe, L. A. 2008. Luteinizing hormone causes MAP kinase – dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development*. 135 (19). 3229 – 3238.

Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V. O., Jaffe, L. A. 2009. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*. 136 (11). 1869 – 1878.

Numagami, Y., Ohnishi, S. T. 2001. S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *Journal of Nutrition*. 131 (3). 1100S–1105S.

Rattan, S., Chakder, S. 1993. Inhibitory effect of CO on internal anal sphincter: Heme oxygenase inhibitor inhibits NANC relaxation. *American Journal Of Physiology*, 4(265), G799-G804.

Reddy, P., Shen, L., Ren, C., Boman, K., Lundin, E., Ottander, U., Lindgren, P., Liu, Y. X., Sun, Q. Y., Liu, K. 2005. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHRL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Developmental Biology*. 281 (2). 160 – 170.

Reis, A., Madgwick, S., Chang, H. Y., Nabti, I., Levasseur, M., Jones, K. T. 2007. Prometaphase APC^{cdh1} activity prevents non – disjunction in mammalian oocytes. *Nature Cell Biology*. 9 (10). 1192 – 1198.

Richard, F. J., Tsafiri, A., Conti, M. 2001. Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. *Biology of Reproduction*. 65 (5). 1444 – 1451.

Richards, J. S., Russell, D. L., Ochsner, S., Hsieh, M., Doyle, K. H., Falender, A. E., Lo, Y. K., Sharma, S. C. 2005. Novel signaling pathways that control ovarian

follicular developmeent, ovulation and luteinization. *Recent Progress in Hormone Research*. 57. 195 – 220.

Richardson B. E., Lehmann R. 2010. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11 (1). 37-49.

Roberts, G. P., Youn, H., Kerby, R. L. 2004. CO-Sensing Mechanisms. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 68(3), 453-473.

Rotenberg, M. O., Maines, M. D. 1991. Characterization of a cDNA-encoding rabbit brain heme oxygenase-2 and identification of a conserved domain among mammalian heme oxygenase isozymes: Possible heme-binding site? *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 290(2), 336-344.

Rucker, E. B., Dierisseau, P., Wagner, K. U., Garret, L., Wynshaw – Boris, A., Flaws, J. A., Hennighausen, L. 2000. Bcl – x and BAX regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Molecular Endocrinology*. 14 (7). 1038 – 1052.

Ryter, S. W., Choi, A. M. K. 2016. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. *Translational Research*, 167(1), 7-34.

Ryter, S. W., Alam, J., Choi, A. M. 2006. Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiological Reviews*, 86(2), 583-650.

Oh, J. S., Han, S. J., Conti, M. 2010. Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *The Journal of Cell Biology*. 188 (2). 199 – 207.

Odrich, M. J., Graham, C. H., Kimura, K. A., McLaughlin, B. E., Marks, G. S., Nakatsu, K., Brien, J. F. 1998. Heme oxygenase and nitric oxide synthase in the placenta of the guinea-pig during gestation. *Placenta*, 19(7), 509-516.

Pandey, A. N., Chaube, S. K. 2014. A moderate increase of hydrogen peroxide level is beneficial for spontaneous resumption of meiosis from diplotene arrest in rat oocytes cultured in vitro. *BioResearch Open Access*. 3 (4). 183-191.

Pandey, A. N., Tripathi, A., Premkumar, K. V., Shrivastav, T. G., Chaube, S. K. 2010. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 111 (3). 521-528.

Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., Moncada, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122), 524-526.

Palmer, A., Gavin, A. C., Nebreda, A. R. 1998. A link between MAP kinase and p34cdc2/cyclin B during oocyte maturation: p90rsk phosphorylates and inactivates the p34cdc2 inhibitory kinase Myt1. *The EMBO Journal*. 17 (17). 5037 – 5047.

Panigone, S., Hsieh, M., Fu, M., Persani, L., Conti, M. 2008. Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Molecular Endocrinology*. 22 (4). 924 – 936.

Peers, C., Boyle, J. P., Scragg, J. L., Dallas, M. L., Al-Owais, M. M., Hettiarachichi, N. T., et al. 2015. Diverse mechanisms underlying the regulation of ion channels by carbon monoxide. *British Journal Of Pharmacology*, 172(6), 1546-1556.

Park, J. Y., Su, Y. Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S. L., Conti, M. 2004. EGF – like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*. 303 (5658). 682 – 684.

Park, J. M., Han, Y. M., Kangwan, N., Lee, S. Y., Jung, M. K., Kim, E. H., Hahm, K. B. 2014. S-allyl cysteine alleviates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric mucosal damages by increasing cyclooxygenase-2 inhibition, heme oxygenase-1 induction, and histone deacetylation inhibition. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 29 (4). 80-92.

Peng, X. R., Hsueh, A. J., La Polt, P. S., Bjersing, L., Ny, T. 1991. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology*. 129 (6). 3200 – 3207.

Perez, G. I., Robles, R., Knudson, C. M., Flaws, J. A., Korsmeyer, S. J., Tilly, J. L. 1999. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax – deficiency. *Nature Genetics*. 21 (2). 200 – 203.

Pepling, M. E. 2006. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis*. 44 (12). 622 – 632.

Pepling, M. E., Spradling, A. C. 2001. The mouse ovary contains germ cell cysts that undergo programmed breakdown to form follicles. *Developmental Biology*. 234 (2). 339 – 351.

Peters, J. M. 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*. 7 (9). 644 – 656.

Petrová, I., Sedmíková, M., Chmelíková, E., Svestková, D., Rajmon, R. 2004. In vitro ageing of porcine oocytes. *Czech Journal of Animal Science*. 49. 93-98.

Petrovska, B. B., Cekovska, S. 2010. Extracts from the history and medical properties of garlic. *Pharmacognosy Reviews*. 4(7). 106-110.

Pfeiffer, M. J., Taher, L., Drexler, H., Suzuki, Y., Makałowski, W., Schwarzer, C. 2015. Differences in embryo quality are associated with differences in oocyte composition: A proteomic study in inbred mice. *Proteomics*, 15(4), 675-687.

Piantadosi, C. A., Carraway, M. S., Babiker, A., Suliman, H. B. 2008. Heme Oxygenase-1 Regulates Cardiac Mitochondrial Biogenesis via Nrf2-Mediated Transcriptional Control of Nuclear Respiratory Factor-1. *Circulation Research*, 103(11), 1232-1240.

Picard, A., Peaucellier, G., Le Bouffant, F., Le Peuch, C., Dorée, M. 1985. Role of protein synthesis and proteases in production and inactivation of maturation – promoting activity during meiotic maturation of starfish oocytes. *Developmental Biology*. 109 (2). 311 – 320.

Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145 (1). 27 – 37.

Pileggi, A., Molano, R. D., Berney, T., Cattan, P., Vizzardelli, C., Oliver, R., Fraker, C., Ricordi, C., Pastori, R. L., Bach, F. H. 2001. Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes*. 50(9). 1983-1991.

Procházka, R., Nagyová, E., Rimkevicová, Z., Nagai, T., Kikuchi, K., Motlík, J. 1991. Lack of effect of oocytectomy on expansion of the porcine cumulus. *Journal of Reproduction and Fertility*. 93 (2). 569 – 576.

Prunier, A., Chopineau, M., Mounier, A. M., Mormede, P. 1993. Patterns of plasma LH, FSH, oestradiol and corticosteroids from birth to the first oestrous cycle in Meishan gilts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 98 (2). 313 – 319.

Poss, K. D., Tonegawa, S. 1997. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 94(20), 10919-10924.

Sagata, N., Daar, I., Oskarsson, M., Showalter, S. D., Vande Woude, G. F. 1989. The product of the *mos* proto – oncogene as a candidate initiator for oocyte maturation. *Science*. 245 (4918). 643 – 646.

Sawyer, H. T., Smith, P., Heath, D. A., Juengel, J. L., Wakefield, S. J., McNatty, K. P. 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biology of Reproduction*. 66 (4). 1134 – 1150.

Sánchez, F., Smitz, J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1822 (12). 1896 – 1912.

Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K., Lai, F. A. 2002. PLC: a spermspecific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development*. 129. 3533–3544.

Sedmíková, M., Petr, J., Dörflerová, A., Nevorál, J., Novotná, B., Krejčová, T., Chmelíková, E., Tůmová, L. 2013. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase (JNK) suppresses porcine oocyte ageing in vitro. *Czech Journal of Animal Science*. 58. 535-545.

Sela – Abramovich, S., Chorev, E., Galiani, D., Dekel, N. 2005. Mitogen – activated protein kinase mediates luteinizing hormone – induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology*. 146 (3). 1236 – 1244.

Sela – Abramovich, S., Edry, I., Galiani, D., Nevo, N., Dekel, N. 2006. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology*. 147 (5). 2280 – 2286.

Shi, H., Jing, X., Wei, X., Perez, R. G., Ren, M., Zhang, X., Lou, H. 2015. S-allyl cysteine activates the Nrf2-dependent antioxidant response and protects neurons against ischemic injury in vitro and in vivo. *Journal of Neurochemistry*. 133 (2). 298-308.

Shibahara, S., Muller, R., Taguchi, H., Yoshida, T. 1985. Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 82(23), 7865-7869.

Schmidt, A., Rauh, N. R., Nigg, E. A., Mayer, T. U. 2006. Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *Journal of Cell Science*. 119 (7). 1213 – 1218.

Schwarz, K. R., Pires, P. R., Mesquita, L. G., Chiaratti, M. R., Leal, C. L. 2014. Effect of nitric oxide on the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway during meiosis resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*, 81(4), 556-564.

Schumacher, A., Wafula, P. O., Teles, A., El-Mousleh, T., Linzke, N., Zenclussen, M. L., et al. 2012. Blockage of Heme Oxygenase-1 Abrogates the

Protective Effect of Regulatory T Cells on Murine Pregnancy and Promotes the Maturation of Dendritic Cells. *Plos One*, 7(8), e42301.

Schumacher, A., Zenclussen, A. C. 2015. Effects of heme oxygenase-1 on innate and adaptive immune responses promoting pregnancy success and allograft tolerance. *Frontiers In Pharmacology*, 5.

Silvestre, F., Boni, R., Fissore, R. A., Tosti, E. 2011. Ca²⁺ signaling during maturation of cumulus – oocyte complex in mammals. *Molecular Reproduction and Development*. 78 (10 – 11). 744 – 756.

Sollwedel, A., Bertoja, A. Z., Zenclussen, M. L., Gerlof, K., Lisewski, U., Wafula, P. 2005. Protection from Abortion by Heme Oxygenase-1 Up-Regulation Is Associated with Increased Levels of Bag-1 and Neuropilin-1 at the Fetal-Maternal Interface. *The Journal Of Immunology*, 175(8), 4875-4885.

Song, H., Lim, H., Paria, B. C., Matsumoto, H., Swift, L. L., Morrow, J. 2002. Cytosolic phospholipase A 2 α is crucial for 'on-time' embryo implantation that directs subsequent development. *Development*, 129(12), 2789-2889.

Soyal, S. M., Amleh, A., Dean, J. 2000. Fig α , a germ cell – specific transcription factor required for ovarian follicle development. *Development*. 127 (21). 4645 – 4655.

Stewart, R. D. 1975. The Effect of Carbon Monoxide on Humans. *Annual Review Of Pharmacology*, 15(1), 409-423.

Stone, J. R., Marletta, M. A. 1994. Soluble Guanylate Cyclase from Bovine Lung: Activation with Nitric Oxide and Carbon Monoxide and Spectral Characterization of the Ferrous and Ferric States. *Biochemistry*, 33(18), 5636-5640.

Suliman, H. B., Carraway, M. S., Tatro, L. G., Piantadosi, C. A. 2007. A new activating role for CO in cardiac mitochondrial biogenesis. *Journal Of Cell Science*, 120(2), 299-308.

Sun, S. C. 2017. The non-canonical NF-kappa B pathway in immunity and inflammation. *Nature reviews imunology*. 17 (9). 545-558.

Suttner, D. M., Dennery, P. A. 1999. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *The FASEB journal*. 13 (13). 1800-1809.

Swiderski, F., Dabrowska, M., Rusaczonok, A., Waszkiewicz-Robak, B. 2007. Bioactive substances of garlic and their role in dietoprophylaxis and dietotherapy. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*. 58 (1). 41-46.

Szabó, C. 2007. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature reviews: Drug discovery*. 6 (11). 917-935.

Taillé, C., El-Benna, J., Lanone, S., Boczkowski, J., Motterlini, R. 2005. Mitochondrial Respiratory Chain and NAD(P)H Oxidase Are Targets for the Antiproliferative Effect of Carbon Monoxide in Human Airway Smooth Muscle. *Journal Of Biological Chemistry*, 280(27), 25350-25360.

Tachibana, M., Watanabe, K., Yamasaki, Y., Suzuki, H., Watarai, M. 2008. Expression of heme oxygenase-1 is associated with abortion caused by *Brucella abortus* infection in pregnant mice. *Microbial Pathogenesis*, 45(2), 105-109.

Tachibana, M., Hashino, M., Nishida, T., Shimizu, T., Watarai, M., Bereswill, S. 2011. Protective Role of Heme Oxygenase-1 in *Listeria monocytogenes*-Induced Abortion. *Plos One*, 6(9), e25046-.

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.

Takai, Y., Matikainen, T., Juriscova, A., Kim, M. R., Trbovich, A. M., Fujita, E., Nakagawa, T., Lemmers, B., Flavell, R. A., Hakem, R., Momoi, T., Yuan, J., Tilly, J. L., Perez, G. I. 2007. Caspase-12 compensates for lack of caspase-2 and caspase-3 in female germ cells. *Apoptosis*. 12 (4). 791–800.

Takemoto, H., Muto, N., Sunagawa, I., Shinjo, A., Nakada, T. 2004. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biology of reproduction*. 71. 1150–1157.

Tam P. P., Snow M. H. 1981. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 64. 133-147.

Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., de Kruif, A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. 2002. *Molecular reproduction and development*. 61 (3). 414-424.

Tarin, J. J., Perez-Albala, S., Aquilar, A., Minarro, J., Hermenegildo, C., Cano, A. 1999. Long-term effects of postovulatory aging of mouse oocytes on offspring: a two-generational study. *Biology of Reproduction*. 61. 1347–1355.

Tarin, J. J., Perez-Albala, S., Perez-Hoyos, P., Cano, A. 2002. Postovulatory aging of oocytes decreases reproductive fitness and longevity of offspring. *Biology of Reproduction*. 66. 495–499.

Tatemoto, H., Sakurai, N., Muto, N. 2000. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. *Biology of reproduction*. 63 (3). 805-810.

Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Usa*, 2(61), 748–755.

Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R. 1969. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *The Journal Of Biological Chemistry*, 23(244), 6388-94.

Tiwari, M., Chaube, S. K. 2016. Moderate increase of reactive oxygen species triggers meiotic resumption in rat follicular oocytes. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 42 (5). 536-546.

Tsiftoglou, A. S., Tsamadou, A. I., Papadopoulou, L. C. 2006. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: Molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacology & Therapeutics*, 111(2), 327-345.

Turkseven, S., Drummond, G., Rezzani, R., Rodella, L., Quan, S., Ikehara, S., Abraham, N. G. 2007. Impact of silencing HO-2 on EC-SOD and the mitochondrial signaling pathway. *Journal Of Cellular Biochemistry*, 100(4), 815-823.

Vaccari, S., Horner, K., Mehlmann, L. M., Conti, M. 2008. Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. *Developmental Biology*. 316 (1). 124 – 134.

Vaccari, S., Weeks, J. L., Hsieh, M., Menniti, F. S., Conti, M. 2009. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone – dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of Reproduction*. 81 (3). 595 – 604.

Vanhoutte, L., Nogueira, D., Gerris, J., Dhont, M., De Sutter, P. 2008. Effect of temporary nuclear arrest by Phosphodiesterase 3-Inhibitor on morphological and functional aspects of in vitro matured mouse oocytes. *Molecular Reproduction And Development*, 75(6), 1021-1030.

Verma, A., Hirsch, D., Glatt, C., Ronnett, G., Snyder, S. 1993. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science*, 5093(259), 381-384.

Vinatier, D., Dufour, P., Tordjeman-Rizzi, N., Prolongeau, J. F., Depret-Moser, S., Monnier, J. C. 1995. Immunological aspects of ovarian function: role of the cytokines. *European Journal Of Obstetrics*, 63(2), 155-168.

Vreman, H. J., Zentner, A. R., Wong, R. J., Stevenson, D. K. 1999. Carbon Monoxide Production and Upregulation of Heme Oxygenase Activity in Mice after Heme Administration. *Pediatric Research*, 45(4, Part 2 of 2), 231A-231A.

Wakayama, S., Thuan, N. V., Kishigami, S., Ohta, H., Mizutani, E., Hikichi, T., Miyake, M., Wakayama, T. 2004. Production of offspring from one-day-old oocytes stored at room temperature. *Journal of Reproduction and Development*. 50. 627–637.

Wang, R., Wang, Z., Wu, L., Hanna, S. T., Peterson-Wakeman, R. 2001. Reduced Vasorelaxant Effect of Carbon Monoxide in Diabetes and the Underlying Mechanisms. *Diabetes*, 50(1), 166-174.

Wang, X., Wang, Y., Kim, H. P., Nakahira, K., Ryter, S. W., Choi, A. M. 2007. Carbon monoxide protects against hyperoxia-induced endothelial cell apoptosis by inhibiting reactive oxygen species formation. *Journal of Biological Chemistry*. 282(3). 1718-172.

Wang, Q., Wang, X. L., Liu, H. R., Rose, P., Zhu, Y. Z. 2010. Protective effects of cysteine analogues on acute myocardial ischemia: novel modulators of endogenous H(2)S production. *Antioxidants & Redox Signaling*.12. 1155–1165.

Wang, N., Satirapod, C., Ohguchi, Y., Park, E. S., Woods, D. C., Tilly, J. L. 2017. Genetic studies in mice directly link oocytes produced during adulthood to ovarian function and natural fertility. *Scientific Reports*. 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-10033-6.

Wassarman, P. M. 1988. The mammalian ovum. In: Knobil, E., Neill, J. et al. (eds.) *The physiology of reproduction*. Raven Press. New York. p. 69 – 102.

Wassarman, P. M., Albertini, D. F. 1994. The mammalian ovum. In: Knobil, E., Neill, J. D. (eds.). *The physiology of reproduction*. 2nd ed. Raven Press. New York. p. 79 – 122.

Watson, A. J. 2007. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of Animal Science*. 85(15). 1-3.

West, A. R., Oates, P. S. 2007. Subcellular location of heme oxygenase 1 and 2 and divalent metal transporter 1 in relation to endocytotic markers during heme iron absorption. *Journal Of Gastroenterology And Hepatology*, 23(1), 150-158.

Wigglesworth, K., Lee, K. B., O'Brien, M. J., Peng, J., Matzuk, M. M., Eppig, J. J. 2013. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110 (4). E3723–E3729.

Wilding, M., Dale, B., Marino, M., di Matteo, L., Alviggi, C., Pisaturo, M. L., Lombardi, L., De Placido, G. 2001. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*. 16. 909–917.

Wilkinson, W. J., Kemp, P. J. 2011. Carbon monoxide: an emerging regulator of ion channels. *The Journal Of Physiology*, 589(13), 3055-3062.

Wu, L., Wang, R. 2005. Carbon Monoxide: Endogenous Production, Physiological Functions, and Pharmacological Applications. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 585-630.

Wu, Y., Wang, X., Liu, J., Bao, Z., Tang, D., Wu, Y., Zeng, S. M. 2011. BIM EL-mediated apoptosis in cumulus cells contributes to degenerative changes in aged oocytes via a paracrine action. *Theriogenology*. 76. 1487–1495.

Wylie, C. C. 1993. The biology of primordial germ cells. *European Urology*. 23 (1). 62 – 66.

Xu, Z., Abbott, A., Kopf, G. S., Schultz, R. M., Ducibella, T. 1997. Spontaneous activation of ovulated mouse eggs: time-dependent effects on M-phase exit, cortical granule exocytosis, maternal messenger ribonucleic acid recruitment, and inositol 1,4,5-trisphosphate sensitivity. *Biology of Reproduction*. 57 (4). 743-750.

Yamauchi, N., Nagai, T. 1999. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine. *Biology of reproduction*. 61 (3). 828-833.

Yanez, L. Z., Han, J., Behr, B. B., Reijo-Pera, R. A., Camarillo, D. B. 2016. Human oocyte developmental potential is predicted by mechanical properties within hours after fertilization. *Nature communication*. 24 (7). 10809.

Yen, H. W., Ford, J. J., Zimmerman, D. R., Johnson, R. K. 2005. Follicular development and maturation in gilts selected for an index of high ovulation rate and high prenatal survival. *Journal of Animal Science*. 83 (1). 130 – 135.

Yoshida, T., Kikuchi, G. 1978. Purification and properties of heme oxygenase from pig spleen microsomes. *Journal Of Biological Chemistry*, 253(1), 4224–4229.

Yoshida, M., Ishigaki, K., Nagai, T., Chikyu, M., Pursel, V. G. 1993. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biology of reproduction*, 49 (1), 89-94.

Yoshiki, N., Kubota, T., Aso, T. 2000. Expression and Localization of Heme Oxygenase in Human Placental Villi. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 276(3), 1136-1142.

Zenclussen, A. C., Joachim, R., Hagen, E., Peiser, C., Klapp, B. F., Arck, P. C. 2002. Heme Oxygenase is Downregulated in Stress-Triggered and Interleukin-12-Mediated Murine Abortion. *Scandinavian Journal Of Immunology*, 55(6), 560-569.

Zenclussen, A. C., Lim, E., Knoeller, S., Knackstedt, M., Hertwig, K., Hagen, E. 2003. Heme Oxygenases in Pregnancy II: HO-2 is Downregulated in Human Pathologic Pregnancies. *American Journal Of Reproductive Immunology*, 50(1), 66-76.

Zenclussen, A. C., Sollwedel, A., Zambon Bertoja, A., Gerlof, K., Zenclussen, M. L., Woiciechowsky, C., Volk, H. 2005. Heme oxygenase as a therapeutic target in immunological pregnancy complications. *International Immunopharmacology*, 5(1), 41-51.

Zenclussen, M. L., Anegon, I., Bertoja, A. Z., Chauveau, C., Vogt, K., Gerlof, K. 2006. Over-expression of heme oxygenase-1 by adenoviral gene transfer improves pregnancy outcome in a murine model of abortion. *Journal Of Reproductive Immunology*, 69(1), 35-52.

Zenclussen, A. C., Schumacher, A., Zenclussen, M. L., Wafula, P., Volk, H. D. 2007. Immunology of pregnancy: cellular mechanisms allowing fetal survival within the maternal uterus. *Expert Reviews In Molecular Medicine*, 9(10),

Zenclussen, M. L., Casalis, P. A., El-Mousleh, T., Rebelo, S., Langwisch, S., Linzke, N. 2011. Haem oxygenase-1 dictates intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. *The Journal Of Pathology*, 225(2), 293-304.

Zenclussen, M. L., Casalis, P. A., Jensen, F., Woidacki, K., Zenclussen, A. C. 2014. Hormonal Fluctuations during the Estrous Cycle Modulate Heme Oxygenase-1 Expression in the Uterus. *Frontiers In Endocrinology*, 5.

Zenclussen, M. L., Linzke, N., Schumacher, A., Fest, S., Meyer, N., Casalis, P. A., Zenclussen, A. C. 2015. Heme oxygenase-1 is critically involved in placentation, spiral artery remodeling, and blood pressure regulation during murine pregnancy. *Frontiers In Pharmacology*, 5.

Zhang, X., Shan, P., Otterbein, L. E., Alam, J., Flavell, R. A., David, R. J., Choi, A. M., Lee, P. J. 2003a. Carbon monoxide inhibition of apoptosis during ischemia-reperfusion lung injury is dependent on the p38 mitogen-activated protein kinase pathway and involves caspase 3. *Journal of Biological Chemistry*. 278(2). 1248-1258.

Zhang, X., Shan, P., Alam, J., David, R. J., Flavell, R. A., Lee, P. J. 2003b. Carbon monoxide modulates Fas/Fas ligand, caspases, and Bcl-2 family proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway during ischemia-reperfusion lung injury. *Journal of Biological Chemistry*. 278(24). 22061-22070.

Zhang, Y., Zhang, Z., Xu, X. Y., Li, X. S., Yu, M., Yu, A. M., Zong, Z. H., Yu, B. Z. 2008. Protein kinase A modulates Cdc25B activity during meiotic resumption of mouse oocytes. *Developmental Dynamics*. 237 (12). 3777 – 3786.

Zhang M., Su Y. Q., Suguira K., Xia G., Eppig J. J. 2010. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science*. 330 (6002). 366 – 369.

Zhao, H., Wong, R. J., Kalish, F. S., Nayak, N. R., Stevenson, D. K. 2009. Effect of Heme Oxygenase-1 Deficiency on Placental Development. *Placenta*, 30(10), 861-868.

Zhao, H., Azuma, J., Kalish, F., Wong, R. J., Stevenson, D. K. 2011. Maternal Heme Oxygenase 1 Regulates Placental Vasculature Development via Angiogenic Factors in Mice. *Biology Of Reproduction*, 85(5), 1005-1012.

Zhou, Q., Li, Y., Nie, R., Friel, P., Mitchell, D., Evanoff, R. M., Pouchnik, D., Banasik, B., McCarrey, J. R., Small, C., Griswold, M. D. 2008. Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 78 (3). 537 – 545.

Zhu, J., Lin, F. H., Zhang, J., Lin, J., Li, H., Li, Y. W., Tan, X. W., Tan, J. H. 2016. The signaling pathways by which the Fas/FasL system accelerates oocyte aging. *Aging*. 8(2). 291-303.

Zuckerman, S. 1951. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Progress in Hormone Research*. 6. 63 – 108.

9 Přílohy

1) Němeček D., Dvořáková M., Heroutová I., Chmelíková E., Sedmíková M. (2017). Anti-apoptotic properties of carbon monoxide in porcine oocyte during in vitro aging. PeerJ 5: e3876.

2) Němeček D., Dvořáková M., Sedmíková M. (2017). Heme oxygenase/carbon monoxide in the female reproductive system: an overlooked signalling pathway. International Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 8(1), 1–12.

3) Dvořáková M., Heroutová I., Němeček D., Zámotná, 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.

4) 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: 65-72.

5) Chmelíková E., Němeček D., Dvořáková M., Heroutová I., Sedmíková M. (2018). Organo-sulphur garlic compounds influence viability of mammalian cells: a review. Scientia Agriculturae Bohemica 49, 9-16.

Anti-apoptotic properties of carbon monoxide in porcine oocyte during *in vitro* aging

David Němeček, Markéta Dvořáková, Ivona Heroutová, Eva Chmelíková and Markéta Sedmíková

Department of Veterinary Sciences, Czech University of Life Sciences, Prague, Czech Republic

ABSTRACT

If fertilization of matured oocyte does not occur, unfertilized oocyte undergoes aging, resulting in a time-dependent reduction of the oocyte's quality. The aging of porcine oocytes can lead to apoptosis. Carbon monoxide (CO), a signal molecule produced by the heme oxygenase (HO), possesses cytoprotective and anti-apoptotic effects that have been described in somatic cells. However, the effects of CO in oocytes have yet to be investigated. By immunocytochemistry method we detected that both isoforms of heme oxygenase (HO-1 and HO-2) are present in the porcine oocytes. Based on the morphological signs of oocyte aging, it was found that the inhibition of both HO isoforms by Zn-protoporphyrin IX (Zn-PP IX) leads to an increase in the number of apoptotic oocytes and decrease in the number of intact oocytes during aging. Contrarily, the presence of CO donors (CORM-2 or CORM-A1) significantly decrease the number of apoptotic oocytes while increasing the number of intact oocytes. We also determined that CO donors significantly decrease the caspase-3 (CAS-3) activity. Our results suggest that HO/CO contributes to the sustaining viability through regulation of apoptosis during *in vitro* aging of porcine oocytes.

Subjects Biotechnology, Cell Biology, Developmental Biology, Veterinary Medicine

Keywords Carbon monoxide, Heme oxygenase, Oocyte, Pigs, Aging, Antiapoptotic, Caspase-3

Submitted 4 April 2017

Accepted 9 September 2017

Published 6 October 2017

Corresponding author

David Němeček,
nemecekd@af.czu.cz

Academic editor

Gary Wessel

Additional Information and
Declarations can be found on
page 19

DOI 10.7717/peerj.3876

© Copyright
2017 Němeček et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

INTRODUCTION

In most mammals, a mature oocyte is in the stage of the metaphase of the second meiotic division, when it awaits fertilization. If the fertilization does not occur within the time referred to as a 'temporal window for optimal fertilization' (Fissore *et al.*, 2002; Goud *et al.*, 2005), a time-dependent decrease in oocyte quality takes place, which is also referred to as post-ovulatory oocyte aging (Fissore *et al.*, 2002; Miao *et al.*, 2009; Lord & Aitken, 2013). In pigs, as well as in other mammals, the aging process takes place in both *in vivo* and *in vitro* conditions (Petrová *et al.*, 2004; Petrová *et al.*, 2009). Oocyte aging is one of the factors limiting various assisted reproductive technologies (ART) outcome in several mammalian species (Miao *et al.*, 2009). Many changes of cellular functions occur during oocyte aging, as well as morphological changes of the cytoskeleton and cellular organelles. The negative effects of aging include premature exocytosis of cortical granules (Szollosi, 1971), structural changes of the *zona pellucida* (Xu *et al.*, 1997), the decrease of the fertilizing capability

(*Lanman, 1968*), increase of polyspermy (*Badenas et al., 1989*), parthenogenesis (*Blandau, 1952*) and chromosomal aberrations (*Szollosi, 1971*).

Several mechanisms contribute to the formation of negative effects of the oocyte aging. Aging process leads to the progressive increase in ROS production and the concomitant depletion of antioxidant protection and as a consequence the post ovulatory aged oocyte experiences a state of oxidative stress (*Lord & Aitken, 2013*). This relates to the disruption in functions of the mitochondria and Ca^{2+} signaling (*Liu, Trimarchi & Keefe, 2000*; *Lord & Aitken, 2013*). Changes in the activity of the M-phase promotion factor (MPF) and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) that maintain the meiotic arrest in metaphase II also occurs during aging (*Kikuchi et al., 1995*; *Miao et al., 2009*; *Jiang et al., 2011*). The decrease of the MPF activity causes parthenogenetic activation in the aged oocytes and consequently cellular death. The increased MAPK activity also contributes to the triggering of cellular death (*Sadler et al., 2004*; *Jeřeta et al., 2008*; *Miao et al., 2009*). Aging process finally leads to lytic or, more often, apoptotic cell death of aged oocytes (*Fissore et al., 2002*; *Miao et al., 2009*; *Petrová et al., 2009*; *Lord & Aitken, 2013*).

Programmed cell death is characterized by the activation of caspases (aspartate-specific cysteine proteases) that are activated upon the receipt of either an extrinsic or intrinsic death signal. Both signals induce the execution phase of the apoptotic pathway characterized by the activation of executioner caspases that subsequently activate cytoplasmic endonucleases and proteases. Their activation leads to characteristic morphological and biochemical changes observed during apoptosis (*Salvesen & Dixit, 1997*; *Slee, Adrain & Martin, 2001*; *Taylor, Cullen & Martin, 2008*). Caspase-3 (CAS-3) is one of the most important executioner caspases. The CAS-3 activity is often used as a marker of apoptotic cell death, regardless of whether the apoptosis was triggered through an extrinsic or intrinsic pathway (*Elmore, 2007*). Similarly, as in somatic cells, also in aged oocytes is CAS-3 activated during apoptotic cell death (*Zhu et al., 2015*; *Zhu et al., 2016*).

Carbon monoxide (CO), endogenously produced by heme oxygenase (HO) or exogenously delivered by CO gas or CO-releasing molecules (CORMs) (*Motterlini et al., 2003*) is one of the known factors that can modulate apoptotic pathway in various types of somatic cells (*Brouard et al., 2000*; *Petrache et al., 2000*; *Wu & Wang, 2005*; *Ryter, Alam & Choi, 2006*; *Kim et al., 2011*), but the effect of CO in oocytes is unknown. HO enzyme catalyzes oxidative cleavage of heme producing ferrous iron, biliverdin-IX α and CO (*Tenhunen, Marver & Schmid, 1968*; *Tenhunen, Marver & Schmid, 1969*). HO exists in two active isoforms, HO-1 and HO-2. HO-1 is an inducible isoform activated by different kinds of stresses (e.g., oxidative stress) (*Biswas et al., 2014*; *Ryter & Choi, 2016*), while the constitutive isoform HO-2 is responsible for the HO basal activity (*Turkseven et al., 2007*; *Muñoz Sánchez & Chánez-Cárdenas, 2014*).

CO influences a variety of signalling pathways and generally has cytoprotective, anti-apoptotic and anti-inflammatory properties (*Motterlini & Otterbein, 2010*). In murine endothelial cells CO suppresses apoptosis through activation of the p38 MAPK (*Brouard et al., 2000*; *Brouard et al., 2002*) and in rat endothelial cells CO prevents the initiation of apoptosis through increasing the expression of anti-apoptotic factor Bcl-2 (*Zhang et al., 2003a*) and decreasing the expression/activation of pro-apoptotic factors Bid and Bax

(Zhang *et al.*, 2003a; Zhang *et al.*, 2003b; Wang *et al.*, 2007a). It further prevents the release of cytochrome c from mitochondrial matrix (Zhang *et al.*, 2003a; Wang *et al.*, 2007a). Overall, CO decreases caspases activation (CAS-3, CAS-8, CAS-9), which was proven in endothelial cells of mice and rats (Zhang *et al.*, 2003a; Zhang *et al.*, 2003b; Wang *et al.*, 2007a; Wang *et al.*, 2011), in murine astrocytes (Almeida *et al.*, 2012), rat ganglion cells (Schallner *et al.*, 2012) and porcine lung tissue (Goebel *et al.*, 2008).

The anti-apoptotic effect of the HO/CO system was investigated in somatic cells, but in the case of oocytes the effect of CO is so far unknown. While it was proven that HO-1 deficiency in mice causes lower fertilization capability of oocytes (Zenclussen *et al.*, 2012), knowledge of the HO/CO significance in oocytes is still insufficient. We assumed that, similarly as in somatic cells, CO could also prevent the apoptotic pathway in oocytes. We hypothesized that CO could improve the viability of porcine oocytes. The aim of our work is to identify the effect of CO on the course of the porcine oocyte aging.

MATERIALS AND METHODS

Collection, cultivation and *in vitro* aging of porcine oocytes

Porcine ovaries were obtained from local slaughterhouses from gilts during an unknown stage of the oestrous cycle. Porcine oocytes were obtained from the ovaries through aspiration of the follicular fluid from follicles (2–5 mm). Only oocytes with intact cytoplasm and compact cumuli were chosen for the experiments. Oocytes were cultivated in the modified M199 medium (Gibco-BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland) containing sodium bicarbonate (32.5 mM), calcium L-lactate (2.75 mM), gentamicin (0.025 mg/ml), HEPES (6.3 mM), 13.5 IU eCG: 6.6 IU hCG/ml (P.G.600; Intervet, Boxmeer, Holland) and 10% (v/v) fetal calf serum (GibcoBRL). Oocytes were cultivated for 48 h up to the metaphase stage of the second meiotic division (MII) in 4-well Petri dishes (Nunc, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 1 ml of cultivation medium; 39 °C; 5,0 % CO₂). Meiotically matured oocytes were denuded and used for *in vitro* aging (24, 48 and 72 h) under the same conditions in the cultivation medium without P.G. 600.

Evaluation of *in vitro* aged porcine oocytes

Upon completion of the *in vitro* aging, the oocytes were fixed in a mixture of ethanol and acetic acid (3:1, w/v, 48 h). Fixed oocytes were stained using 1.0% (w/v) orcein. The oocytes were classified into four groups according to the morphological signs of aging: intact oocytes (oocytes in the stages: metaphase II, anaphase II or telophase II), parthenogenetically activated oocytes (embryos and oocytes containing pronuclei), apoptotic oocytes (called fragmented oocytes; oocytes containing apoptotic vesicles under the *zona pellucida*) and lysed oocytes (oocytes with loss of integrity and rupture of cytoplasmic membrane) (Petrová *et al.*, 2004).

Immunocytochemical detection of heme oxygenase and cleaved caspase-3

Upon completion of the oocyte cultivation period, *zona pellucida* was removed (0.1% pronase). Subsequently, the oocytes were fixed in 2.5% (w/v) paraformaldehyde

in Phosphate-buffered saline (PBS). The oocyte membrane was permeabilized by 0.5% (w/v) Triton X in PBS with 0.01% (w/v) BSA. After rinsing in PBS with 0.1% (w/v) Tween 20 followed incubation with the primary antibody anti-heme oxygenase 1 or anti-heme oxygenase 2 (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan; 1:200) or anti-cleaved caspase-3 (Asp175) (Cell Signaling Technology, Danvers, USA; 1:400). The incubation period took over 14-16 h in moisture at a temperature of 4 °C in 0.1 % (w/v) BSA and 0.01 % (w/v) Tween 20 in PBS. After incubation, the oocytes were rinsed with 0.1% (w/v) Tween 20 in PBS and cultivated with secondary anti-mouse IgG antibody conjugated with fluorescein-5-isothiocyanate (FITC, Sigma–Aldrich GmbH, Munich, Germany; 1:100) or anti-rabbit IgG conjugated with FITC (ThermoFisher Scientific, Rockford, USA; 1:500). The incubation with the secondary antibody took place at laboratory temperature in 0.1% (w/v) BSA and 0.01% (w/v) Tween 20 in PBS over the course of one hour in darkness. After incubation, the oocytes were rinsed in 0.1% (w/v) Tween 20 in PBS.

The chromatin was stained using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma–Aldrich GmbH, Munich, Germany). To exclude non-specific secondary antibody binding the oocytes in the control group were treated in the same way as the experimental group, except that primary antibody incubation was not performed. Oocytes were mounted on slides and images were acquired using confocal scanning microscope (Zeiss, Germany). The images were analyzed in NIS Elements AR Software (NIKON, Japan). The data was expressed as mean signal intensity of the FITC fluorescence, reduced by a basal signal intensity of appropriate negative control. Each experiment was repeated at least three times at a minimal amount of 15 oocytes in each experimental group.

Western blot

Western blot was performed for validation of the antibodies specificity in accordance to [Tůmová et al. \(2013\)](#). Briefly, MII oocytes were lysed and separated by SDS-PAGE. After blotting the membranes were incubated with primary antibodies—anti-heme oxygenase-1, anti-heme oxygenase-2 (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan; 1:1,000) or cleaved caspase-3 (Asp175) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; 1:1,000) and then with secondary antibodies—Mouse IgG (Amersham GE Healthcare, Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom; 1:30,000) or rabbit IgG (Amersham GE Healthcare, Life Sciences, United Kingdom; 1:120,000). Proteins were detected by ECL Advanced Western blotting detection kit (Amersham GE Healthcare, Life Sciences, United Kingdom). Each western blot was repeated at least three times with a minimal amount of 200 oocytes.

***In vitro* cultivation of aging oocytes with exogenous CO donors or heme oxygenase inhibitor**

Oocytes were cultivated in a cultivation media with the CO donors: CORM-2 (tricarbonyl dichlororuthenium (II) dimer; Sigma–Aldrich GmbH, Munich, Germany) at concentrations of 5, 25, 50 and 100 μM , dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) or CORM-A1 (sodium boranocarbonate; Sigma–Aldrich GmbH, Munich, Germany) at concentrations of 25, 50 and 100 μM , dissolved in H_2O . CORM-2 and CORM-A1 both have distinct rate of

CO release, wherein CORM-2 is a fast CO releaser, whereas CORM-A1 shows a slow and gradual CO release (Motterlini *et al.*, 2002; Motterlini, Mann & Foresti, 2005). In the case of HO inhibition, the oocytes were cultivated in a cultivation medium with HO inhibitor Zn-protoporphyrin IX (Zn-PP IX; Sigma–Aldrich GmbH, Munich, Germany), at concentrations of 2.5, 5 and 25 μ M dissolved in DMSO. In order to eliminate the effect of DMSO on the aging of porcine oocytes, a control group was incubated in a cultivation medium containing only DMSO. In order to confirm the effect of CO, oocytes were cultivated in cultivation medium with ruthenium (III) chloride (inactive CORM2; iCORM-2; Sigma–Aldrich GmbH, Munich, Germany) or inactive CORM-A1 (iCORM-A1). iCORM-A1 consisted of CORM-A1 prepared in 0.1 M HCl bubbled with N₂ gas for 10 min to dissipate all of the CO and then the pH of the solution was adjusted to 7.4. The effect of the iCORMs at comparable concentrations was not significant compared to oocytes cultivated in pure cultivation medium (Table S1). Upon completion of the given cultivation period, the oocytes were morphologically evaluated or prepared for immunocytochemical technique. Each experiment was repeated at least three times and at least 80 oocytes were used for each experimental group.

Statistical analysis

Data from all experiments were subjected to statistical analysis. All experiments were repeated at least three times. The SAS 9.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used for statistical analysis. Significant differences between groups were determined using analysis of variance (ANOVA) followed by Scheffé's method. A *p*-value of less than 0.05 was considered significant. Significant differences among different groups of oocytes are indicated by different symbols.

RESULTS

Heme oxygenase isoforms are present in porcine oocyte during *in vitro* aging

The objective of the experiment was to localize HO-1 and HO-2 in meiotically mature porcine oocytes (MII) and oocytes exposed to *in vitro* aging for the period of 24, 48 and 72 h. HO isoforms are present in porcine oocyte (Figs. 1 and 2), and their expression gradually increase during *in vitro* aging. In case of HO-1, the signal was predominant in the nucleus/perichromosomal area (Fig. 2). On the contrary, the HO-2 signal was mainly observed in the oocyte cytoplasm (Fig. 3).

During the *in vitro* aging, the expression of both isoforms increased primarily in the oocyte cytoplasm. In comparison with meiotically matured oocytes, in oocytes aged 24 h the expression of HO-1 increased by 2.2 ± 0.2 times, aged 48 h increased by 3.5 ± 0.3 times and aged 72 h increased by 6.7 ± 1.3 times (Fig. 4A). In the case of HO-2, the expression in oocytes aged 24 h increased by 1.3 ± 0.1 times, aged 48 h increased by 1.7 ± 0.14 times, and in oocytes aged 72 h increased by 3.1 ± 0.6 times (Fig. 4B).

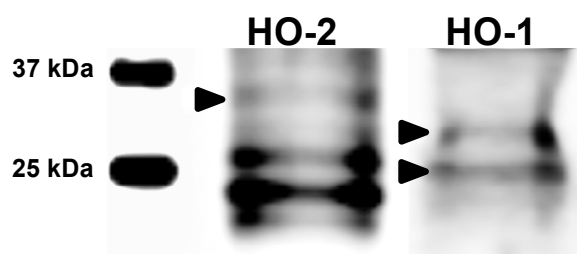


Figure 1 Immunoblotting of HO isoforms (HO-2, MW~35,7 kDa; HO-1, MW~33/28 kDa) in porcine oocytes. Oocytes were matured to the second metaphase stage (MII stage). Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and then incubated with HO specific antibodies (anti-HO1, anti-HO2; both 1:1,000). One sample contained proteins from 200 oocytes. HO1 and HO2 and their truncated forms were detected by specific antibodies. The arrows indicate bands corresponding to the molecular weight of the HO protein.

The inhibition of heme oxygenase increases the ratio of apoptotic porcine oocytes during the *in vitro* aging

This experiment focused on the effect of HO inhibition by HO inhibitor Zn-protoporphyrin IX (Zn-PP IX) on *in vitro* aging of porcine oocytes. After 24 h of *in vitro* aging, the effect was significant only when the highest concentration of Zn-PP IX (25 μ M) was used, where the amount of intact oocytes in comparison to the control group decreased by 10.6% (94.0 ± 1.5 vs. $83.4 \pm 2.1\%$ for control and HO inhibitor, respectively) (Fig. 5A). In other concentrations of Zn-PP IX, the effect on the morphological signs of aging was not significant.

After 48 h of *in vitro* aging in the presence of Zn-PP IX, the effect was significant in all concentrations, causing decreases in the ratio of intact oocytes and increases in the ratio of apoptotic oocytes. In oocytes treated with Zn-PP IX, the ratio of intact oocytes decreased by 11.1–12.9% (67.1 ± 1.6 vs. 54.2 ± 2.1 – $56.0 \pm 1.7\%$ for control and HO inhibitor, respectively) while the ratio of apoptotic oocytes increased by 5.6–9.4% (21.5 ± 2.3 vs. 27.0 ± 1.1 – $30.8 \pm 2.4\%$ for control and HO inhibitor, respectively). Moreover, the highest concentration of inhibitor (25 μ M) also increased the ratio of lytic oocytes by 8.3% (1.1 ± 1.5 vs. $9.4 \pm 1.6\%$ for control and HO inhibitor, respectively). The effects of different concentrations of inhibitor did not differ significantly (Fig. 5B).

The most obvious manifestation of negative signs of aging was observed in oocytes aged 72 h, wherein the ratio of apoptotic oocytes reached 60.4 ± 3.7 – $67.5 \pm 3.4\%$ in all groups (control and experimental). However, the effect of the HO inhibitor was not significant (Fig. 5C).

CO donors suppress apoptosis in porcine oocytes during the *in vitro* aging

The objective of this experiment was to identify the effect of CO on the course of *in vitro* aging of porcine oocytes evaluated based on morphological signs of aging. As the CO source, we used two CO donors (CORM-2 or CORM-A1) each with different CO release kinetic. The control group of oocytes was cultivated in the presence of inactive compounds (iCORM-2 or iCORM-A1) to eliminate its effect. It was found that CO delivered by

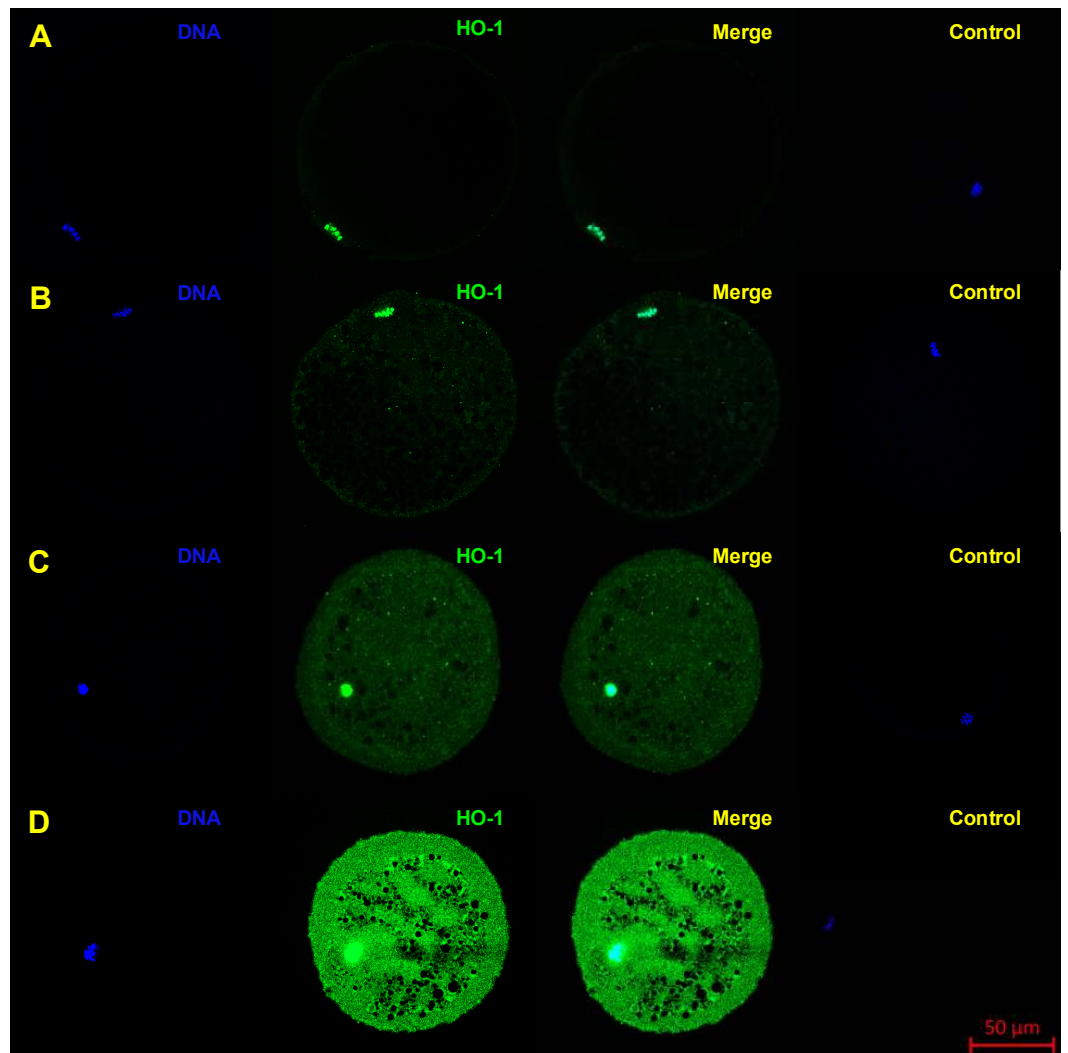


Figure 2 Localization of HO-1 in meiotically matured porcine oocytes (MII) (A) and in oocytes exposed to *in vitro* aging for 24 (B), 48 (C) and 72 (D) hours. HO-1 is shown in green (FITC), chromatin is shown in blue (DAPI), magnified 400 \times .

CORMs causing decreases in the ratio of apoptotic oocytes and increases in the ratio of intact oocytes.

The effect of the CO donors on *in vitro* aging became apparent after 48 h of *in vitro* aging. The effect of CORM-A1 was significant at the concentrations 25 and 50 μ M, which decreased the ratio of apoptotic oocytes by 10.2–14.4% (30.3 ± 4.3 vs. 15.6 ± 5.8 – 19.8 ± 4.6 for control and CORM-A1, respectively) and simultaneously increased the ration of intact oocytes by 12.6–16.0% (59.8 ± 3.6 vs. 72.3 ± 3.8 – 75.7 ± 3.7 for control and CORM-A1, respectively) (Figs. 6A and 6B). The difference between control group and group cultivated in the CORM-A1 at the concentration 100 μ M was not significant. The effect of CORM-2 was significant in all concentrations. CORM-2 decreased the ratio of apoptotic oocytes by 6.7–9.9% (21.5 ± 1.3 vs. 11.5 ± 1.5 – $14.8 \pm 0.3\%$ for control and CORM-2, respectively),

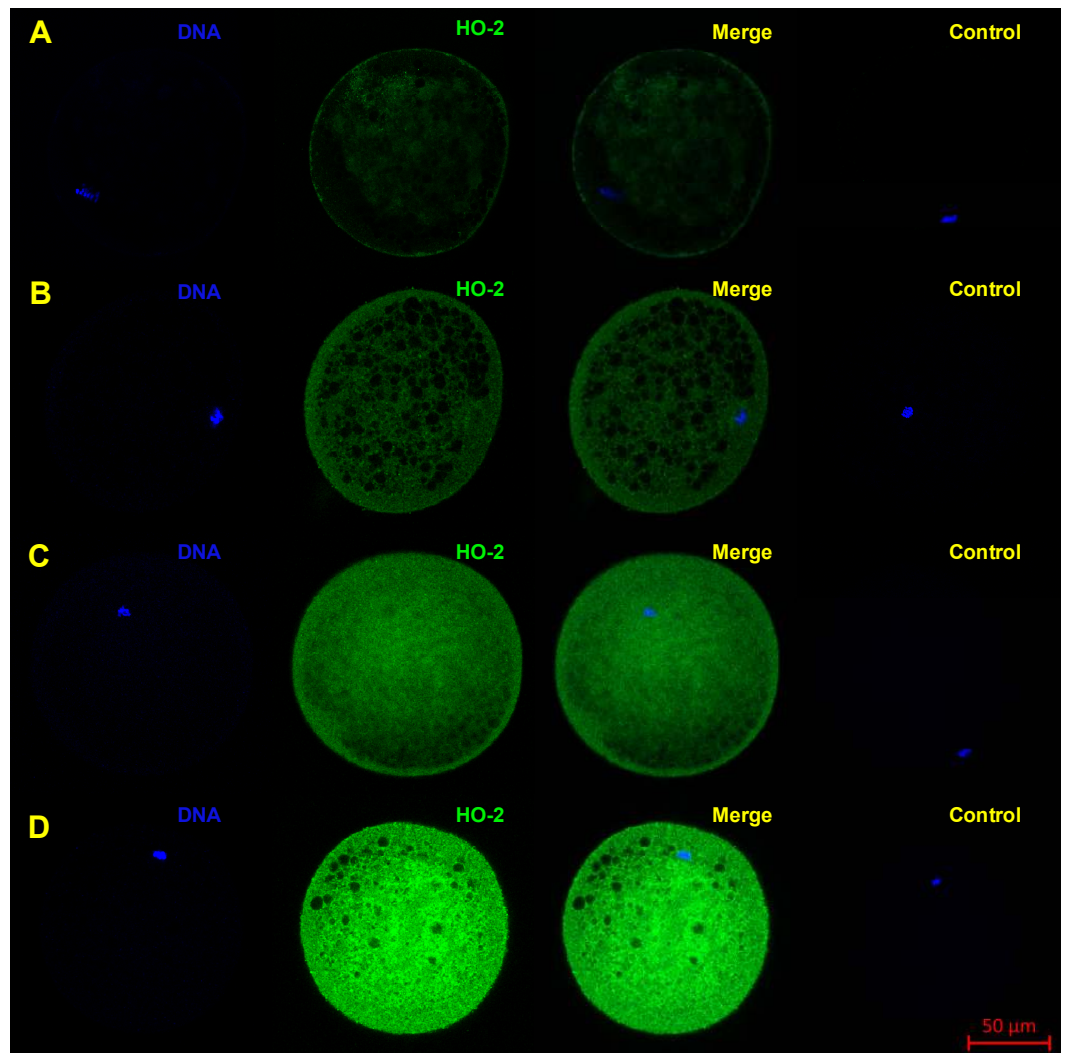


Figure 3 Localization of HO-2 in meiotically mature porcine oocytes (MII) (A) and in oocytes exposed to *in vitro* aging for 24 (B), 48 (C) and 72 (D) hours. HO-2 is shown in green (FITC), chromatin is shown in blue (DAPI), magnified 400 \times .

while simultaneously increased the ratio of intact oocytes by 8.6–13.5% (67.1 ± 1.6 vs. 75.7 ± 1.4 – $80.6 \pm 1.4\%$ for control and CORM-2, respectively). The effects of different concentrations of CORM-2 did not differ significantly (Figs. 7A and 7B).

Both CO donors significantly suppressed apoptosis even in oocytes aged 72 h. The effect of CORM-A1 was significant at the concentrations 50 and 100 μM , which decreased the ratio of apoptotic oocytes by 12.3–14.3% (59.5 ± 3.6 vs. 45.2 ± 7.3 – 47.2 ± 3.2 for control and CORM-A1, respectively) and simultaneously increased the ratio of intact oocytes by 11.2–12.5% (28.8 ± 3.7 vs. 40.0 ± 7.3 – 41.3 ± 6.0 for control and CORM-A1, respectively) (Fig. 6C). The difference between control group and group cultivated in the CORM-A1 concentration 25 μM was not significant. As with oocytes aged 48 h, also in oocytes aged 72 h the effect of CORM-2 was significant in all concentrations. CORM-2 decreased the

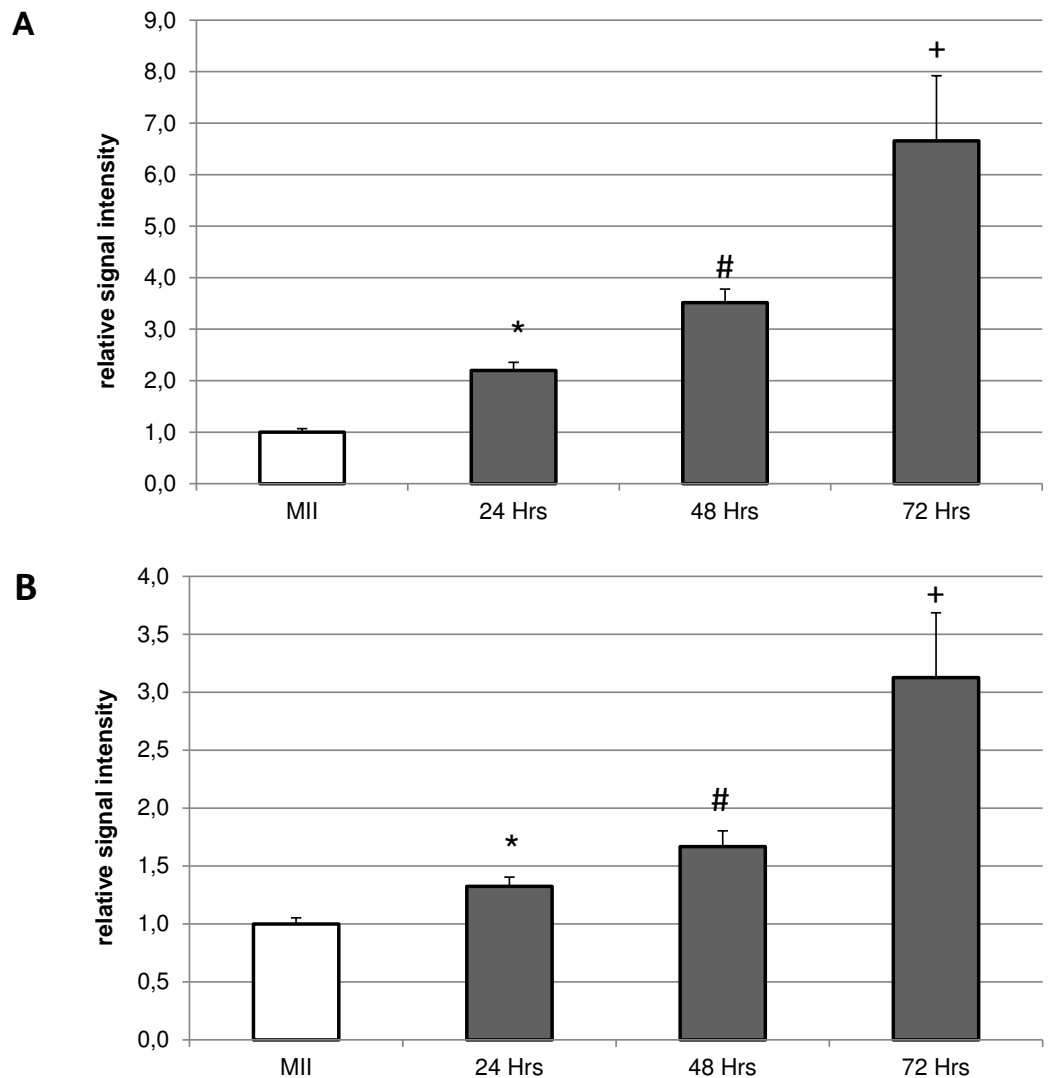


Figure 4 Expression of HO-1 (A) and HO-2 (B) in meiotically matured (MII) porcine oocytes and oocytes exposed to *in vitro* aging for 24, 48 and 72 h. The level of expression of HO-1 and HO-2 was determined as the mean intensity of the given isoform's signal in porcine oocytes and related to the average signal intensity of the given HO isoform in meiotically matured (MII) oocytes. Bars show the mean \pm SEM. *# + indicates significant differences in the HO-1 and HO-2 signal intensity ($P < 0.05$).

ratio of apoptotic oocytes by 8.9–17.4% (60.4 ± 2.7 vs. 43.0 ± 3.6 – $51.5 \pm 1.5\%$ for control and CORM-2, respectively) while increased the ratio of intact oocytes by 12.6–21.6% (17.5 ± 1.7 vs. 30.1 ± 2.4 – $39.1 \pm 2.2\%$ for control and CORM-2, respectively). The effects of different concentrations of CORM-2 did not differ significantly (Fig. 7C).

CO donors decrease the activity of caspase-3 in porcine oocytes during the *in vitro* aging

This experiment focused on the effect of CO donors CORM-2 or CORM-A1 on the fluorescence intensity of activated CAS-3 (cleaved CAS-3; cCAS-3) as a marker of apoptosis.

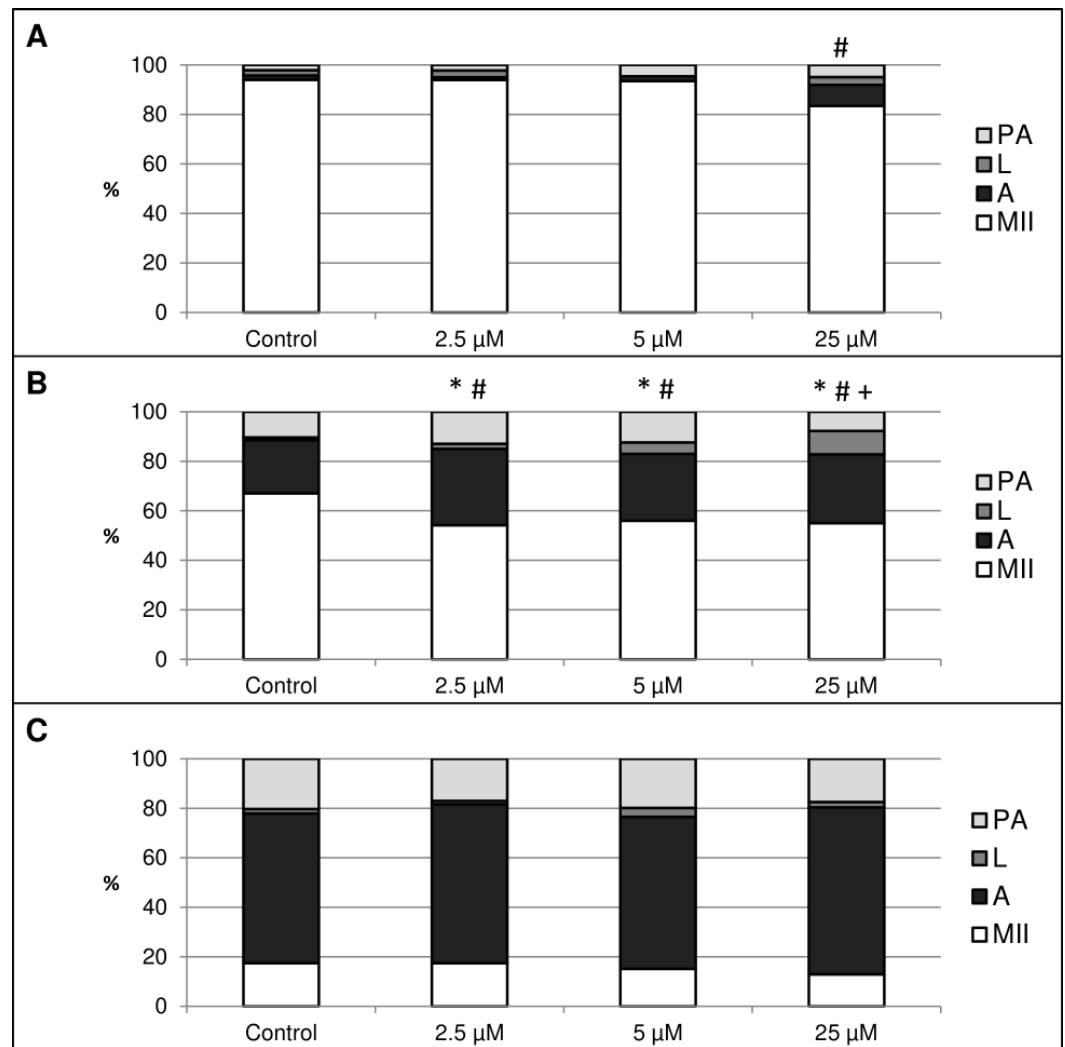


Figure 5 The effect of the HO inhibitor zinc protoporphyrin IX (Zn-PP IX) on the porcine oocytes during *in vitro* aging for 24 (A), 48 (B) and 72 (C) hours. Control group was cultivated in a medium containing DMSO. The experimental group was cultivated in a medium containing Zn-PP IX at the concentrations of 2.5, 5 and 25 μM . Data is expressed in a relative manner. The stages of *in vitro* aging were morphologically evaluated as: intact (MII), lytic (L), parthenogenetically activated (PA) and apoptotic (A). * indicates significant difference in the ratio of intact (MII) oocytes between different concentrations of inhibitor and control group ($P < 0.05$). # indicates significant difference in ratio of apoptotic (A) oocytes between different concentrations of inhibitor and control group ($P < 0.05$). + indicates significant difference in ratio of lytic (L) oocytes between different concentrations of inhibitor and control group. No significant difference was found in the ration of parthenogenetically activated (PA) oocytes between different concentrations of inhibitor and control group.

It was found that the CO donors decrease the fluorescence intensity of cCAS-3 during *in vitro* aging (Figs. 8–10).

The effect of both CO donors on the activity of CAS-3 was significant in all groups, i.e., in oocytes aged 24, 48 and 72 h. In the case of CORM-2, the effect of different concentrations did not differ significantly, whereas the effect of CORM-A1 differs depending to the concentration. We observed the most significant effect of both CO donors in oocytes aged

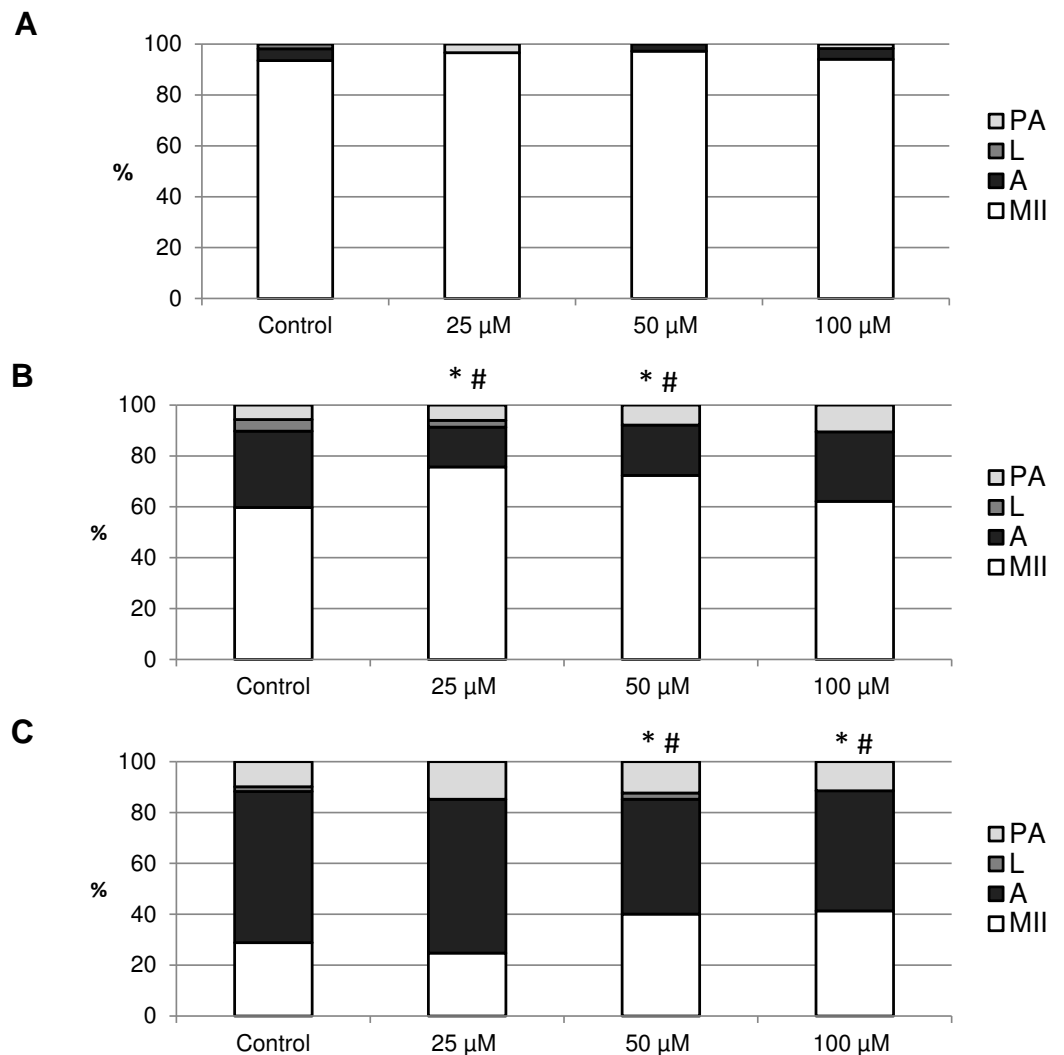


Figure 6 The effect of the CO donor CORM-A1 on the porcine oocytes during *in vitro* aging for 24 (A), 48 (B) and 72 (C) hours. The control group was cultivated in a medium containing an inactive form of CO donor (iCORM-A1; 100 μM). The experimental group was cultivated in a medium containing CORM-A1 at the concentrations of 25, 50 and 100 μM. The data is expressed in a relative manner. Stages of *in vitro* aging were determined morphologically as: intact (MII), lytic (L), parthenogenetically activated (PA) and apoptotic (A). * indicates significant difference in the ratio of intact (MII) oocytes between different concentrations of CORM-A1 and control group ($P < 0.05$). # indicates significant difference in the ratio of apoptotic (A) oocytes between different concentrations of CORM-A1 and control group ($P < 0.05$). No significant difference was found in the ration of parthenogenetically activated (PA) and lytic (L) oocytes between different concentrations of CORM-A1 and control group.

24 h, wherein CORM-A1 causing decreases of cCAS-3 fluorescence intensity by 40.9–48.5% (100.0 ± 6.0 vs. 51.6 ± 6.2 – $59.2 \pm 5.9\%$ for control and CORM-A1 at the concentrations 25 and 50 μM, respectively). The effect of CORM-A1 at the concentration 100 μM was less significant and decreased cCAS-3 fluorescence intensity by 16.5% (100.0 ± 6.0 vs. $83.5 \pm 5.2\%$ for control and CORM-A1 at the concentrations 100 μM, respectively). In the case

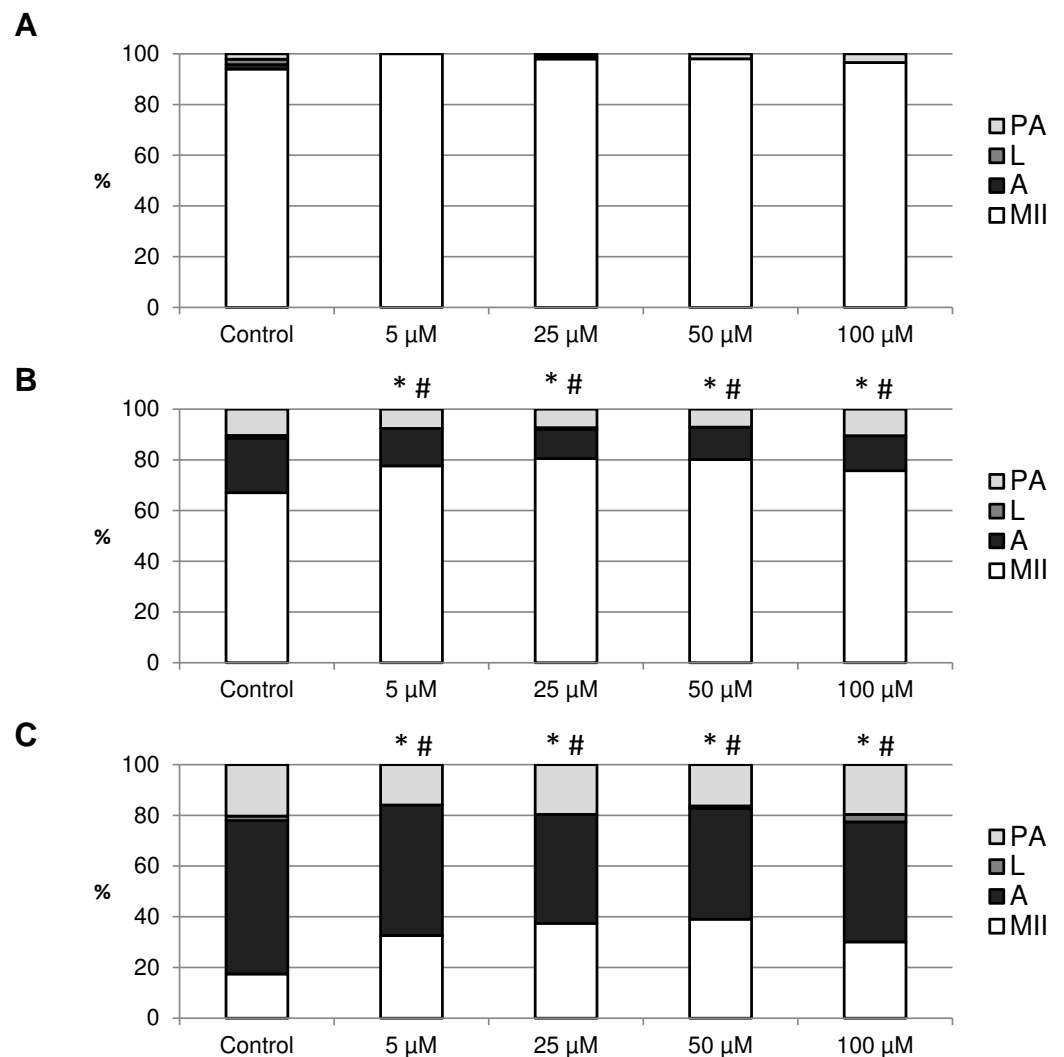


Figure 7 The effect of the CO donor CORM-2 on the porcine oocytes during *in vitro* aging for 24 (A), 48 (B) and 72 (C) hours. The control group (C) was cultivated in a medium containing an inactive form of CO donor (iCORM-2; 100 μM). The experimental group was cultivated in a medium containing CORM-2 at the concentrations of 5, 25, 50 and 100 μM. The data is expressed in a relative manner. Stages of *in vitro* aging were determined morphologically as: intact (MII), lytic (L), parthenogenetically activated (PA) and apoptotic (A). * indicates significant difference in the ratio of intact (MII) oocytes between different concentrations of CORM-A1 and control group ($P < 0.05$). # indicates significant difference in the ratio of apoptotic (A) oocytes between different concentrations of CORM-A1 and control group ($P < 0.05$). No significant difference was found in the ration of parthenogenetically activated (PA) and lytic (L) oocytes between different concentrations of CORM-2 and control group.

of CORM-2, the cCAS-3 fluorescence intensity decreased by 55.6–63.7% (100.0 ± 8.5 vs. 36.3 ± 4.5 – $44.4 \pm 2.7\%$ for control and CORM-2, respectively).

After 48 and 72 h of *in vitro* aging, the cCAS-3 fluorescence intensity was significantly lower in comparison with oocytes aged 24 h, however, the cultivation of oocytes with the CO donors also lead to the significant decrease of cCAS-3 fluorescence intensity. In group of oocytes aged 48 h with CORM-A1 the cCAS-3 fluorescence intensity decreased

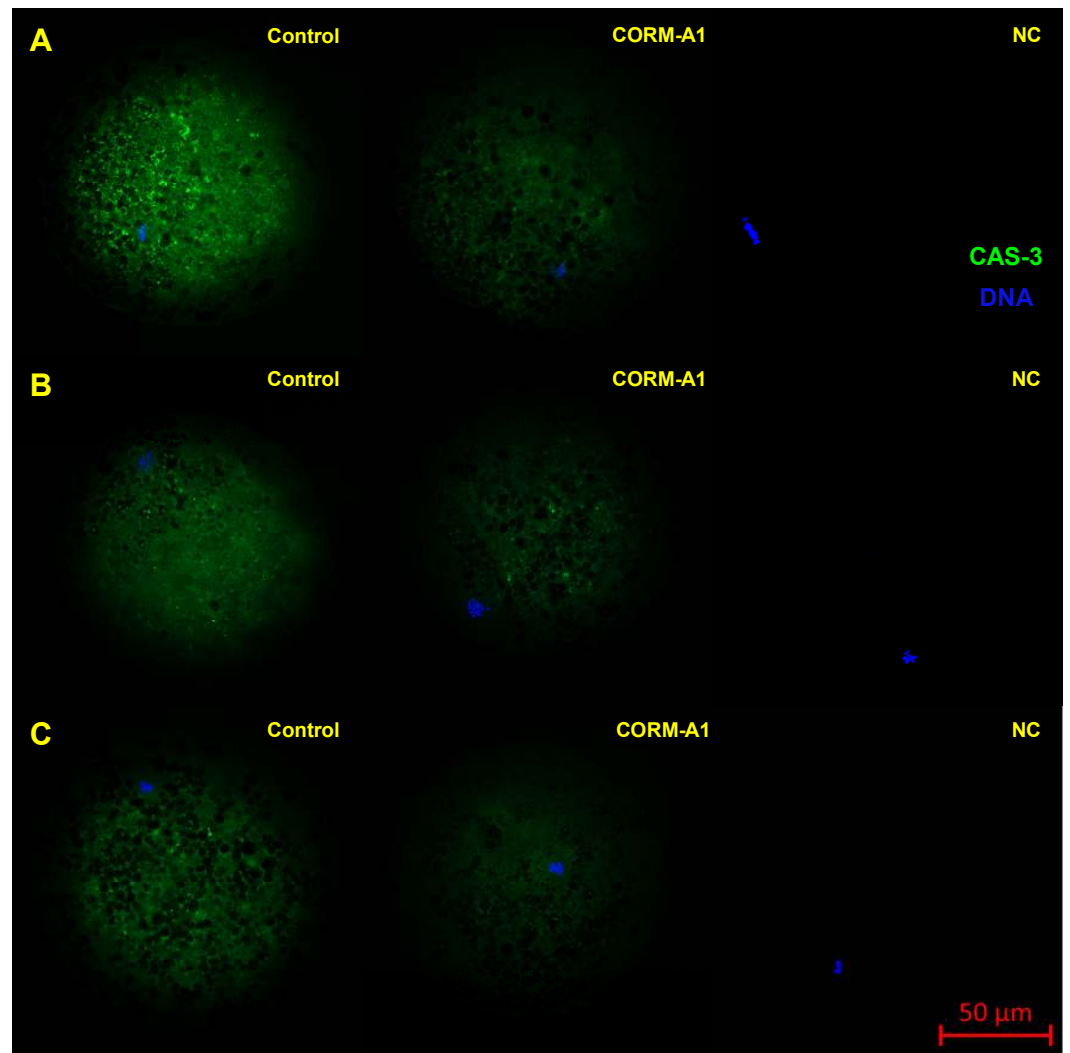


Figure 8 Typical expression pattern of activated CAS-3 (cleaved CAS-3) in porcine oocytes during *in vitro* aging for 24 (A), 48 (B) and 72 (C) hours in the presence of CO donor CORM-A1 at the concentrations of 25 and 50 μM . The control group represents oocytes cultivated with an inactive form of the CO donor (iCORM-A1). The experimental group represents oocytes cultivated with CORM-A1. The negative control group (NC) represents oocytes treated only with secondary antibody. Cleaved CAS-3 is shown in green (FITC), chromatin is shown in blue (DAPI), magnified 400 \times .

by 16.7–23.5% (65.6 ± 10.3 vs. 42.1 ± 4.5 – 48.9 ± 4.9 for control and CORM-A1 at the concentrations 25 and 50 μM , respectively). The effect of CORM-A1 at the concentration 100 μM was not significant (Fig. 11). In the case of CORM-2 the cCAS-3 fluorescence intensity decreased by 13.1–22.4% (35.3 ± 2.9 vs. 13.1 ± 1.8 – 22.4 ± 1.8 for control and CORM-2, respectively) in oocytes aged 48 h (Fig. 12). In group of oocytes aged 72 h with CORM-A1 the cCAS-3 fluorescence intensity decreased by 13.4–22.9% (69.0 ± 7.6 vs. 46.1 ± 8.7 – 55.6 ± 5.2 for control and CORM-A1 at the concentrations 25 and 50 μM , respectively). The effect of CORM-A1 at the concentration 100 μM was not significant. In

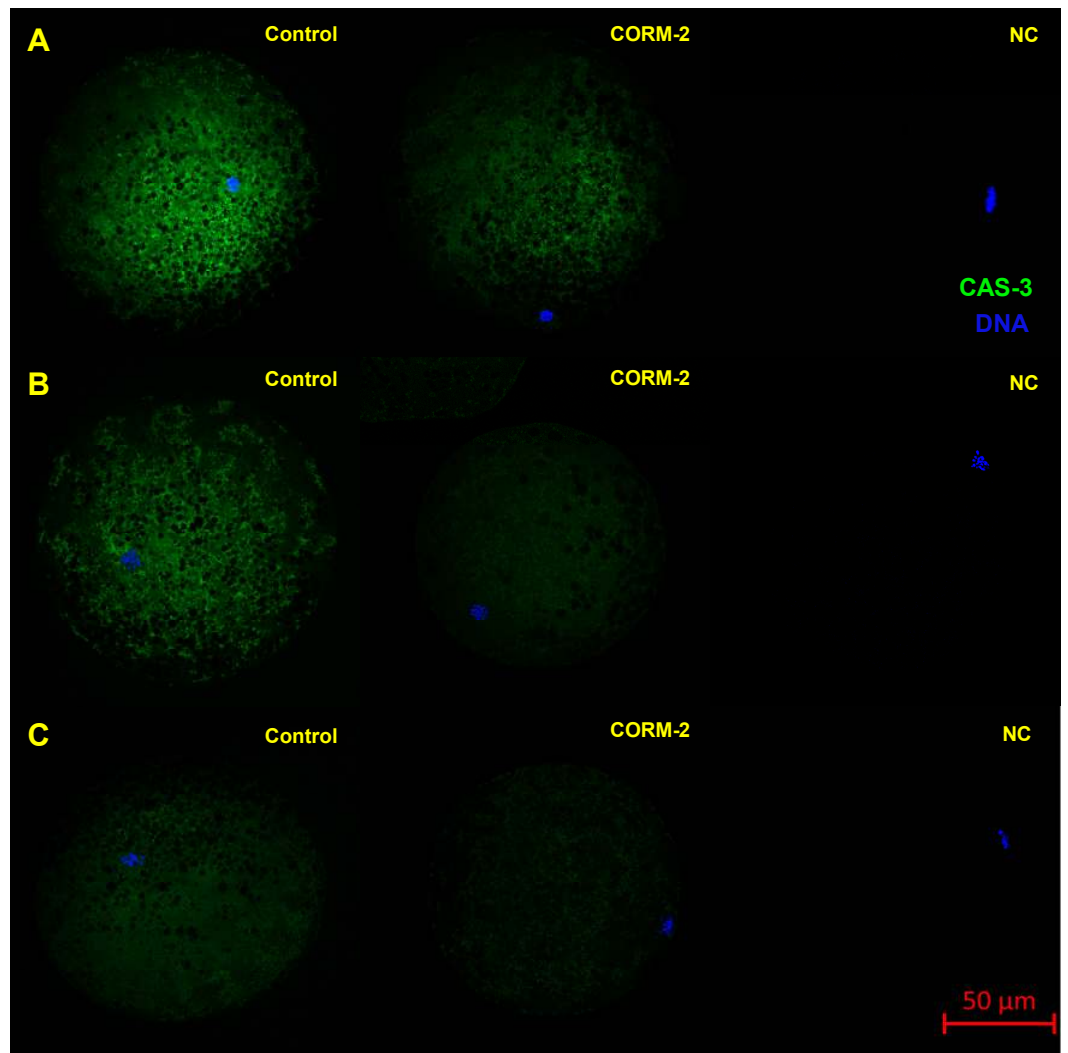


Figure 9 Typical expression pattern of activated CAS-3 (cleaved CAS-3) in porcine oocytes during *in vitro* aging for 24 (A), 48 (B) and 72 (C) hours in the presence of CO donor CORM-2. The control group represents oocytes cultivated with an inactive form of the CO donor (iCORM-2). The experimental group represents oocytes cultivated with CORM-2. The negative control group (NC) represents oocytes treated only with secondary antibody. Cleaved CAS-3 is shown in green (FITC), chromatin is shown in blue (DAPI), magnified 400 \times .

the case of CORM-2 the cCAS-3 fluorescence intensity decreased by 10.8–14.1% (24.9 ± 5.2 vs. 10.8 ± 3.8 – 14.1 ± 2.0 for control and CORM-2, respectively) in oocytes aged 72 h.

DISCUSSION

Post-ovulatory oocyte aging causes progressive decrease in oocyte quality and ultimately leads to cell death. Heme oxygenase (HO) is essential enzyme which cytoprotective properties being caused by the production of an important signalling molecule, carbon monoxide (CO) (Wu & Wang, 2005). Together with hydrogen sulfide (H₂S) and nitric oxide (NO), CO belongs to gasotransmitters, which are a subfamily of endogenous

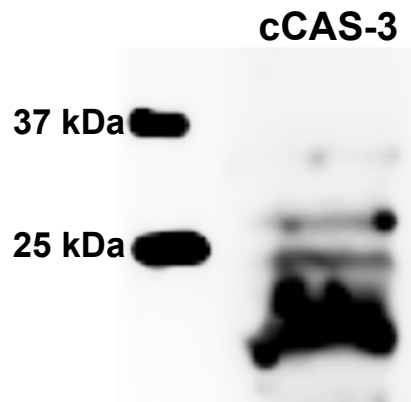


Figure 10 Immunoblotting of cleaved caspase 3 (cCAS-3, MW~17/19 kDa) in porcine oocytes. Oocytes were meiotically matured in the second metaphase (MII stage). Proteins were separated on SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and then incubated with CAS-3 specific antibodies (anti-cleaved caspase-3 (Asp175)). One sample contained proteins from 400 oocytes.

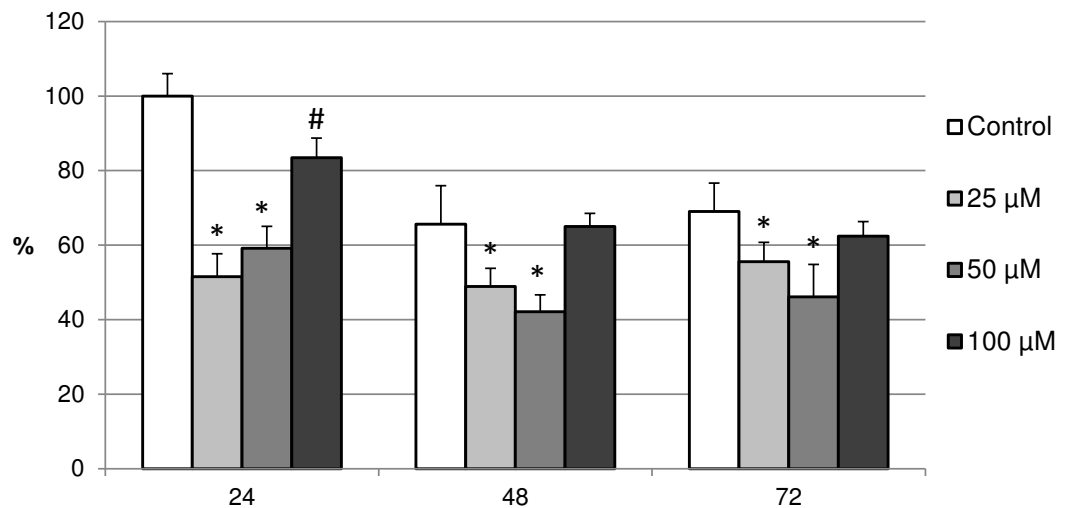


Figure 11 The effect of the CO donor CORM-A1 on the expression of activated CAS-3 during *in vitro* aging of porcine oocytes for 24, 48 and 72 h. The data of expression of the activated CAS-3 are related to the data of expression of the activated CAS-3 in oocytes in the control group, exposed to *in vitro* aging for 24 h. The control group represents oocytes cultivated in a medium containing an inactive form of the CO donor (iCORM-A1; 100 μM). The experimental group was cultivated in a medium containing CORM-A1 at the concentrations of 25, 50 and 100 μM. Bars show mean ± SEM. *# indicate significant differences in the level of expression of the activated CAS-3 between different concentrations of CORM-A1 or control group for each aging time separately ($P < 0.05$).

molecules of gases or gaseous signalling molecules. The role of H₂S and NO as signal molecules in porcine oocytes was identified (Bu *et al.*, 2003; Goud *et al.*, 2005; Nevoral *et al.*, 2014; Krejčová *et al.*, 2015), but information regarding the function of the HO/CO system is yet to be unavailable. Our work proves the presence of both HO isoforms in porcine oocytes and characterizes the effect of the HO inhibitor and CO donors on the course of *in vitro* aging of porcine oocytes.

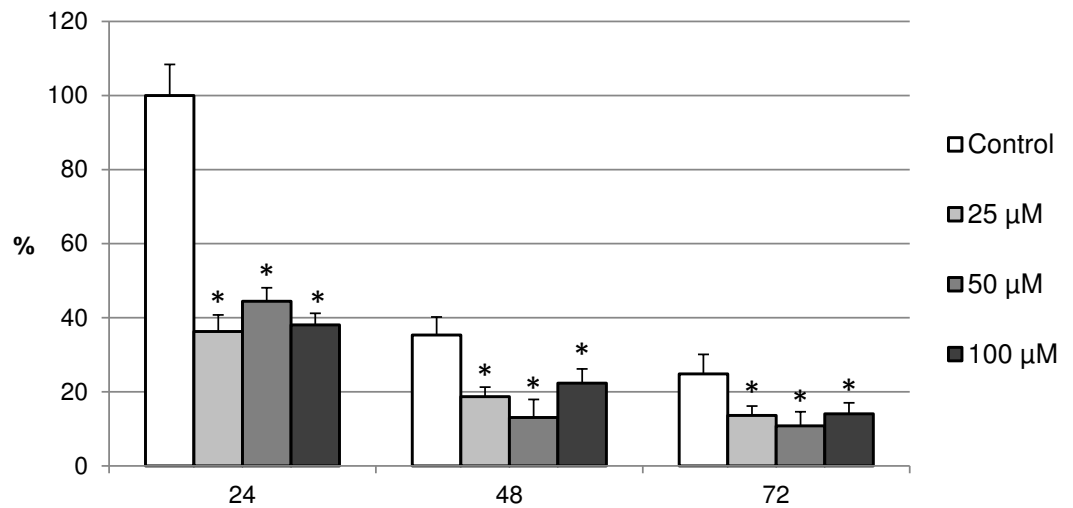


Figure 12 The effect of the CO donor CORM-2 on the expression of activated CAS-3 during *in vitro* aging of porcine oocytes for 24, 48 and 72 h. The data of expression of the activated CAS-3 are related to the data of expression of the activated CAS-3 in oocytes in the control group exposed to *in vitro* aging for 24 h. The control group represents oocytes cultivated in a medium containing an inactive form of the CO donor (iCORM-2; 100 μM). The experimental group was cultivated in a medium containing CORM-2 at the concentrations of 25, 50 and 100 μM. Bars show mean ± SEM. * indicates significant differences in the level of expression of the activated CAS-3 between different concentrations of CORM-2 and control group for each aging time separately ($P < 0.05$).

We have shown that both HO isoforms (HO-1 and HO-2) are localized in meiotically matured and aged porcine oocytes and that over the course of *in vitro* aging, the expression of both HO isoforms increase. The HO-1 is a member of the superfamily of stress proteins, the expression of which increase in reaction to a wide spectrum of inducers (for example oxidative stress) (Dennerly, 2000; Ryter, Alam & Choi, 2006). The increased expression of the HO-1 isoform and higher production of CO decrease the production of reactive oxygen species (ROS) and suppress apoptosis (Pileggi et al., 2001; Li et al., 2016). We also assumed that HO-1/CO has the anti-apoptotic effect in oocytes. The increased expression of HO-1 during the *in vitro* aging of porcine oocytes, which we described, is likely induced by an increased production of ROS. High level of ROS is considered to be a major factor responsible for negative signs of aging in aged oocytes (Lord & Aitken, 2013). We also observed an increased expression of the HO-2 isoform. HO-2 is generally considered to be a constitutively expressed isoform responsible for a stable production of CO, whose level of expression does not respond to the effect of stress factors (Turkseven et al., 2007; Muñoz Sánchez & Cháñez-Cárdenas, 2014). However, some authors have reported that in response to the stress factors the expression of HO-2 can also increase, which has cytoprotective effect (Kim et al., 2008; Ding et al., 2011). We suggest that both HO-1 and HO-2 can modulate ROS levels and suppress aging process in porcine oocytes.

The HO isoforms differed in their intracellular localization. It was found that the HO-1 was localized in meiotically mature and aged porcine oocytes predominantly in the area of chromosomes, and during the *in vitro* aging the HO-1 expression increased primarily

in the cytoplasm. On the other hand, HO-2 was primarily localized in the cytoplasm. In general, HO-1 and HO-2 are considered to be proteins bound to the membrane of endoplasmic reticulum (Yoshida & Kikuchi, 1978; Ma et al., 2004), however, they may also be localized in other cellular compartments. HO-1 may be localized in caveolae, mitochondria and the nucleus (Dunn et al., 2014). Nuclear translocation of HO-1 requires cleavage of the membrane bound domain yielding ~28 kDa protein fragment (Lin et al., 2007; Linnenbaum et al., 2012). The transfer of HO-1 into the nucleus takes place in the reaction to stress factors, and the nuclear HO-1 protects cells from the effect of oxidative stress (Lin et al., 2007). We assumed that this isoform may have similar function also in porcine oocytes. Meiotic maturation of oocytes under *in vitro* conditions is endangered by increased oxidative stress in comparison with *in vivo* conditions (Dvořáková et al., 2016). Because HO-1 is present in the perichromosomal area in matured oocytes, we assumed that the transfer of HO-1 could have already taken place during the meiotic maturation, due to possible oxidative stress.

We had proved that in porcine oocytes, the HO/CO contributes to sustaining their viability and affects the regulation of apoptosis. HO inhibition using Zn-PP IX leads to apoptosis in somatic cells (Hirai et al., 2007), which we also observed in our experiments. Porcine oocyte aging in the presence of the HO inhibitor worsened the effect of aging and increased the ratio of apoptotic oocytes. In the oocytes aged 24 h, the effect of the inhibitor was observable in the group cultivated with the highest concentration of the inhibitor (25 μ M). In the oocyte aged 48 h, the effect of the inhibitor was significant in all concentrations; however the differences between the individual concentrations on proportion of apoptotic, parthenogenetically activated and intact oocytes were not significant. Given that the Zn-PP IX, particularly in higher concentrations, may also inhibit nitric oxide synthase (NOS) and soluble guanylyl cyclase (sGC) (Luo & Vincent, 1994; Grundemar & Ny, 1997), the possibility that this effect also appeared in our experiments cannot be excluded. However, Appleton et al. (1999) state that at the low concentrations of Zn-PP IX (up to 5 μ M) there is selective inhibition of HO activity with minor effect on sGC and NOS. Therefore we assume that the non-selective inhibition could be seen only at the highest concentration (25 μ M) used by us. Although the inhibition of sGC leads to the increased occurrence of negative signs of oocyte aging (Goud et al., 2005), the NOS inhibition, on the contrary, decreases the ratio of apoptotic oocytes (Nevoral et al., 2014). The increased production of NO through inducible-NOS (i-NOS) isoform in the cell contributes to the formation of oxidative stress (Wang et al., 2007b). It is therefore possible that while the inhibitor Zn-PP IX suppresses the protective effect of HO/CO, it also simultaneously decreases oxidative stress through iNOS inhibition.

This work is the first that proved the cytoprotective effect of CO on oocyte aging. As a source of CO we used CORM-2 and CORM-A1. CORM-2 and CORM-A1 both have distinct rates of CO release (Motterlini et al., 2002; Motterlini, Mann & Foresti, 2005). Both CO donors increased the ratio of intact oocytes and decreased the ratio of apoptotic oocytes during *in vitro* aging. In somatic cells, it was proved that HO/CO affects the viability of cells and apoptosis through the regulation of activity of pro-apoptotic and

anti-apoptotic proteins. CO decreases the level of apoptosis, for example, through up-regulation of expression of the anti-apoptotic factor Bcl-2 and down-regulation of the activity of caspase-3 (Zhang et al., 2003a; Cepinskas et al., 2007). Caspase-3 activation also occurs during oocyte aging (Zhu et al., 2015; Zhu et al., 2016). As apparent from the results obtained, the CAS-3 attains highest activity in oocytes during the first day of aging, while over the course of the following days the activity of CAS-3 is significantly lower. Suppressing its activity through the CO donors affected the entire course of cultivation of the aging oocytes; but it was most significant, precisely during the first 24 h of aging. However, the fact that the effect also lasted through the following days of aging could be a consequence of the fact that CO has the ability of pre-conditioning, where a short exposure to CO subsequently leads to increased resistance of cells against stressors and thus to decreased level of apoptosis (Queiroga et al., 2012; Andreadou et al., 2015). Both CO donors suppress apoptosis even each of them has slightly different effect. The effect of CORM-2 on the ratio of apoptotic oocytes and the CAS-3 activity was not dose-dependent. However, in the case of CORM-A1, we observed the effect of different concentrations. We attribute it to the different kinetics of CO release from CORM-A1 and CORM-2 (Mottetline & Foresti, 2017).

The mechanism through which CO affects CAS-3 activity is apparently complex, because CO may regulate the apoptotic pathway by multiple mechanisms. Beside the modulation of ROS levels, CO can modulate activity of c-jun terminal kinase (JNK), a member of the MAPK family. In somatic cells, CO decreases the activity of JNK (Morse et al., 2003) while in aging of porcine oocytes, it leads to the decrease of its activity and suppression of apoptosis (Sedmíková et al., 2013). Additionally, CO may suppress apoptosis through the modulation of the level of Ca^{2+} . In somatic cells, CO may decrease the Ca^{2+} level (Lin & McGrath, 1988; Gende, 2004; Lim et al., 2005), while in aging oocytes the release of Ca^{2+} can trigger the cell death (Gordo et al., 2002; Zhu et al., 2016). Another molecular target for CO includes pro-apoptotic and anti-apoptotic factors. In somatic cells, CO increases the expression of the anti-apoptotic factor Bcl-2 and decreases the expression of the pro-apoptotic factors Bid and Bax (Zhang et al., 2003a; Zhang et al., 2003b; Wang et al., 2007a). It is possible that CO may also act in a similar manner in oocytes.

CONCLUSIONS

These experiments have shown that the CO donors suppress negative signs of aging in porcine oocytes and inhibit apoptosis through reduction of CAS-3 activity. For these reasons, it can be assumed that the HO/CO system is functional in porcine oocytes and that it contributes to sustaining the viability of oocytes and regulates the programmed cell death of oocytes.

ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

Funding

This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (NAZV–Project No. QJ1510138) and by Internal Grant Agency of the Czech University of Life Sciences Prague (CIGA) (Projects No. CZU20152022 and CZU20142049). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:

Ministry of Agriculture of the Czech Republic NAZV: QJ1510138.

Internal Grant Agency of the Czech University of Life Sciences Prague (CIGA): CZU20152022, CZU20142049.

Competing Interests

The authors declare there are no competing interests.

Author Contributions

- David Němeček conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, wrote the paper, prepared figures and/or tables.
- Markéta Dvořáková and Ivona Heroutová performed the experiments.
- Eva Chmelíková performed the experiments, reviewed drafts of the paper.
- Markéta Sedmíková conceived and designed the experiments, reviewed drafts of the paper.

Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.3876#supplemental-information>.

REFERENCES

- Almeida AS, Queiroga CS, Sousa MF, Alves PM, Vieria HL. 2012.** Carbon monoxide modulates apoptosis by reinforcing oxidative metabolism in astrocytes: role of Bcl-2. *Journal of Biological Chemistry* **287**(14):10761–10770 DOI [10.1074/jbc.M111.306738](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.306738).
- Andreadou I, Efstathios K, Iliodromitis EK, Rassaf T, Schulz R, Papapetropoulos A, Ferdinandy P. 2015.** The role of gasotransmitters NO, H₂S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning. *British Journal of Pharmacology* **172**(6):1587–1606 DOI [10.1111/bph.12811](https://doi.org/10.1111/bph.12811).
- Appleton SD, Chretien ML, McLaughlin BE, Vreman HJ, Stevenson DK, Brien JF, Nakatsu K, Maurice DH, Marks GS. 1999.** Selective inhibition of heme oxygenase, without of nitric oxide synthase or soluble guanylyl cyclase, by metalloporphyrins at low concentrations. *Drug Metabolism & Disposition* **27**(10):1214–1219.

- Badenas J, Santaló J, Calafell JM, Estop AM, 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 DOI [10.1002/mrd.1120240208](https://doi.org/10.1002/mrd.1120240208).
- Biswas C, Shah N, Muthu M, La P, Fernando AP, Sengupta S, Yang G, Dennery PA. 2014.** Nuclear heme oxygenase-1 (HO-1) modulates subcellular distribution and activation of Nrf2, impacting metabolic and anti-oxidant defenses. *Journal of Biological Chemistry* **289**(39):26882–26894 DOI [10.1074/jbc.M114.567685](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567685).
- Blandau RJ. 1952.** The female factor in fertility and infertility. I. Effects of delayed fertilization on the development of the pronuclei in rat ova. *Fertility and Sterility* **3**(5):349–365 DOI [10.1016/S0015-0282\(16\)31020-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)31020-2).
- Brouard S, Berberat PO, Tobiasch E, Seldon MP, Bach FH, Soares MP. 2002.** Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **277**(20):17950–17961 DOI [10.1074/jbc.M108317200](https://doi.org/10.1074/jbc.M108317200).
- Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AK, Soares MP. 2000.** Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine* **192**(7):1015–1026 DOI [10.1084/jem.192.7.1015](https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1015).
- Bu S, Xia G, Tao Y, Lei L, Zhou B. 2003.** Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology* **207**(1–2):21–30 DOI [10.1016/S0303-7207\(03\)00213-2](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(03)00213-2).
- Cepinskas G, Katada K, Bihari A, Potter RF. 2007.** Carbon monoxide liberated from carbon monoxide-releasing molecule CORM-2 attenuates inflammation in the liver of septic mice. *The American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* **294**(1):G184–G191 DOI [10.1152/ajpgi.00348.2007](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00348.2007).
- Dennery PA. 2000.** Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury. *Current Topics in Cellular Regulation* **1**(36):181–199 DOI [10.1016/S0070-2137\(01\)80008-X](https://doi.org/10.1016/S0070-2137(01)80008-X).
- Ding B, Gibbs PEM, Brookes PS, Maines MD. 2011.** The coordinated increased expression of biliverdin reductase and heme oxygenase-2 promotes cardiomyocyte survival: a reductase-based peptide counters β -adrenergic receptor ligand-mediated cardiac dysfunction. *The FASEB Journal* **25**(1):301–313 DOI [10.1096/fj.10-166454](https://doi.org/10.1096/fj.10-166454).
- Dunn LL, Midwinter RG, Ni J, Hamid HA, Parish CHR, Stocker R. 2014.** New insights into intracellular locations and functions of heme oxygenase-1. *Antioxidants* **20**(11):1723–1742 DOI [10.1089/ars.2013.5675](https://doi.org/10.1089/ars.2013.5675).
- Dvořáková M, Heroutová I, Němeček D, Adámková K, Krejčová T, Nevala J. 2016.** The antioxidative properties of S-allyl cysteine not only influence somatic cells but also improve early embryo cleavage in pigs. *PeerJ* **4**:e2280 DOI [10.7717/peerj.2280](https://doi.org/10.7717/peerj.2280).
- Elmore S. 2007.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* **35**(4):495–516 DOI [10.1080/01926230701320337](https://doi.org/10.1080/01926230701320337).
- Fissore R, Kurokawa M, Knott J, Zhang M, Smyth J. 2002.** Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction* **124**(6):745–754 DOI [10.1530/rep.0.1240745](https://doi.org/10.1530/rep.0.1240745).

- Gende OA. 2004.** Carbon monoxide inhibits capacitative calcium entry in human platelets. *Thrombosis Research* **114**(2):113–119 DOI [10.1016/j.thromres.2004.04.015](https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.04.015).
- Goebel U, Siepe M, Mecklenburg A, Stein P, Roesslein M, Schwer CI, Schmidt R, Doerst T, Geiger KK, Pahl HL, Schlensak C, Loop T. 2008.** Carbon monoxide inhalation reduces pulmonary inflammatory response during cardiopulmonary bypass in pigs. *Anesthesiology* **108**(6):1025–1036 DOI [10.1097/ALN.0b013e3181733115](https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181733115).
- Gordo AC, Rodrigues P, Kurokawa M, Jellerette T, Ellerette EE, Warner C, Fissore R. 2002.** Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation in *in vitro* aged mouse eggs. *Biology of Reproduction* **66**(6):1828–1837 DOI [10.1095/biolreprod66.6.1828](https://doi.org/10.1095/biolreprod66.6.1828).
- Goud AP, Goud PT, Diamond MP, Abu-Soud HM. 2005.** Nitric oxide delays oocyte aging. *Biochemistry* **44**(34):11361–11368 DOI [10.1021/bi050711f](https://doi.org/10.1021/bi050711f).
- Grundemar L, Ny L. 1997.** Pitfalls using metalloporphyrins in carbon monoxide research. *Trends in Pharmacological Sciences* **18**(6):193–195 DOI [10.1016/S0165-6147\(97\)01065-1](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(97)01065-1).
- Hirai K, Sasahira T, Ohmori H, Fuji K, Kuniyasu H. 2007.** Inhibition of heme oxygenase-1 by zinc protoporphyrin IX reduces tumor growth of LL/2 lung cancer in C57BL mice. *International Journal of Cancer* **120**(3):500–505 DOI [10.1002/ijc.22287](https://doi.org/10.1002/ijc.22287).
- Jeřeta M, Petr J, Krejčová T, Chmelíková E, Jílek F. 2008.** *In vitro* ageing of pig oocytes: effects of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *Zygote* **16**(2):145–152 DOI [10.1017/S0967199408004668](https://doi.org/10.1017/S0967199408004668).
- Jiang GJ, Wang K, Miao DQ, Guo L, Hou Y, Schatten H, Sun QY, Singh SR. 2011.** Protein profile changes during porcine oocyte aging and effects of caffeine on protein expression patterns. *PLOS ONE* **6**(12):e28996 DOI [10.1371/journal.pone.0028996](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028996).
- Kikuchi K, Izaike Y, Noguchi J, Furukawa T, Daen FP, Naito K, Toyoda Y. 1995.** Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* **105**(2):325–330 DOI [10.1530/jrf.0.1050325](https://doi.org/10.1530/jrf.0.1050325).
- Kim YM, Choi BM, Kim YS, Kwon YG, Kibbe MR, Billiar TR, Tzeng E. 2008.** Protective effect of p53 in vascular smooth muscle cells against nitric oxide-induced apoptosis is mediated by up-regulation of heme oxygenase-2. *BMB Reports* **41**(2):164–169 DOI [10.5483/BMBRep.2008.41.2.164](https://doi.org/10.5483/BMBRep.2008.41.2.164).
- Kim YM, Pae HO, Park JE, Lee YC, Woo JM, Kim NH, Choi YK, Lee BS, Kim SR, Chung HT. 2011.** Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* **14**(1):137–167 DOI [10.1089/ars.2010.3153](https://doi.org/10.1089/ars.2010.3153).
- Krejčová T, Šmelcová M, Petr J, Bodart JF, Sedmíková M, Nevorál J, Dvořáková M, Vyskočilová A, Weingartova 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):e0116964 DOI [10.1371/journal.pone.0116964](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116964).
- Lanman JT. 1968.** Delays during reproduction and their effects on the embryo and fetus—aging of sperm. *New England Journal of Medicine* **278**(18):993–999 DOI [10.1056/NEJM196805022781806](https://doi.org/10.1056/NEJM196805022781806).

- Li C, Zhang C, Wang T, Xuan J, Su C, Wang Y. 2016.** Heme oxygenase 1 induction protects myocardial cells against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis. *Herz* **41(8)**:715–724 DOI [10.1007/s00059-016-4424-6](https://doi.org/10.1007/s00059-016-4424-6).
- Lim I, Gibbons SJ, Lyford GL, Miller SM, Strege PR, Sarr MG, Chatterjee S, Szurszewski JH, Shah VH, Farrugia G. 2005.** Carbon monoxide activates human intestinal smooth muscle L-type Ca²⁺ channels through a nitric oxide dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **288(1)**:G7–G14 DOI [10.1152/ajpgi.00205.2004](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00205.2004).
- Lin H, McGrath JJ. 1988.** Carbon monoxide effects on calcium levels in vascular smooth muscle. *Life Sciences* **43(22)**:1813–1816 DOI [10.1016/0024-3205\(88\)90280-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(88)90280-9).
- Lin Q, Weis S, Yang G, Weng YH, Helston R, Rish K, Smith A, Bordner J, Polte T, Gaunitz F, Dennery PA. 2007.** Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **282(28)**:20621–20633 DOI [10.1074/jbc.M607954200](https://doi.org/10.1074/jbc.M607954200).
- Linnenbaum M, Busker M, Kraehling JR, Behrends S. 2012.** Heme oxygenase isoforms differ in their subcellular trafficking during hypoxia and are differentially modulated by cytochrome P450 reductase. *PLOS ONE* **7(4)**:e35483 DOI [10.1371/journal.pone.0035483](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035483).
- Liu L, Trimarchi JR, Keefe DL. 2000.** Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biology of Reproduction* **62(6)**:1745–1753 DOI [10.1095/biolreprod62.6.1745](https://doi.org/10.1095/biolreprod62.6.1745).
- Lord T, Aitken RJ. 2013.** Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction* **146(6)**:R217–R227 DOI [10.1530/REP-13-0111](https://doi.org/10.1530/REP-13-0111).
- Luo D, Vincent SR. 1994.** Metalloporphyrins inhibit nitric oxide-dependent cGMP formation *in vivo*. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology* **267(3)**:263–267 DOI [10.1016/0922-4106\(94\)90149-X](https://doi.org/10.1016/0922-4106(94)90149-X).
- Ma N, Ding X, Doi M, Izumi N, Semba R. 2004.** Cellular and subcellular localization of heme oxygenase-2 in monkey retina. *Journal of Neurocytology* **33(4)**:407–415 DOI [10.1023/B:NEUR.0000046571.90786.6e](https://doi.org/10.1023/B:NEUR.0000046571.90786.6e).
- Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H. 2009.** Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reproduction Update* **15(5)**:573–585 DOI [10.1093/humupd/dmp014](https://doi.org/10.1093/humupd/dmp014).
- Morse D, Pischke SE, Zhou Z, Davis RJ, Flavell RA, Loop T, Otterbein SL, Otterbein LE, Choi AM. 2003.** Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. *Journal of Biological Chemistry* **278(39)**:36993–36998 DOI [10.1074/jbc.M302942200](https://doi.org/10.1074/jbc.M302942200).
- Motterline R, Foresti R. 2017.** Biological signaling by carbon monoxide and carbon monoxide-releasing molecules. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **312(3)**:C302–C313 DOI [10.1152/ajpcell.00360.2016](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00360.2016).
- Motterlini R, Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Mann BE, Green CJ. 2002.** Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities. *Circulation Research* **90(2)**:E17–E24 DOI [10.1161/hh0202.104530](https://doi.org/10.1161/hh0202.104530).

- Motterlini R, Mann BE, Foresti R. 2005.** Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **14(11)**:1305–1318 DOI [10.1517/13543784.14.11.1305](https://doi.org/10.1517/13543784.14.11.1305).
- Motterlini R, Mann BE, Johnson TR, Clark JE, Foresti R, Green CJ. 2003.** Bioactivity and pharmacological actions of carbon monoxide-releasing molecules. *Current Pharmaceutical Design* **9(30)**:2525–2539 DOI [10.2174/1381612033453785](https://doi.org/10.2174/1381612033453785).
- Motterlini R, Otterbein LE. 2010.** The therapeutical potential of carbon monoxide. *Nature Reviews. Drug Discovery* **9(9)**:728–743 DOI [10.1038/nrd3228](https://doi.org/10.1038/nrd3228).
- Muñoz Sánchez J, Chánez-Cárdenas ME. 2014.** A review on hemoxygenase-2: focus on cellular protection and oxygen response. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2014**:1–16 DOI [10.1155/2014/604981](https://doi.org/10.1155/2014/604981).
- Nevoral J, Petr J, Gelaude A, Bodart JF, Kučerová-Chrpová V, Sedmíková M, Krejčová T, Kolbabová T, Dvořáková M, Vyskočilová A, Weingartová I, Krivohlávková 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)**:e99613 DOI [10.1371/journal.pone.0099613](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099613).
- Petrache I, Otterbein LE, Alam J, Weigand GW, Choi AMK. 2000.** Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha induced apoptosis in cultured fibroblasts. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **278(3)**:312–319.
- Petrová I, Sedmíková M, Chmelíkova E, Svestková D, Rajmon R. 2004.** *In vitro* ageing of porcine oocytes. *Czech Journal of Animal Science* **49**:93–98 DOI [10.1017/S0967199408004668](https://doi.org/10.1017/S0967199408004668).
- Petrová I, Sedmíková M, Petr J, Vodková Z, Pytloun P, Chmelíková E, Reháček D, Čtrnáctá A, Rajmon R, Jílek F. 2009.** The roles of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in aged pig oocytes. *Journal of Reproduction and Development* **55(1)**:75–82 DOI [10.1262/jrd.20061](https://doi.org/10.1262/jrd.20061).
- Pileggi A, Molano RD, Berney T, Cattani P, Vizzardelli C, Oliver R, Fraker C, Ricordi C, Pastori RL, Bach FH, Inverardi L. 2001.** Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved *in vivo* function after transplantation. *Diabetes* **50(9)**:1983–1991 DOI [10.2337/diabetes.50.9.1983](https://doi.org/10.2337/diabetes.50.9.1983).
- Queiroga CS, Tomasi S, Widerøe M, Alves PM, Vercelli A, Vieira HL. 2012.** Preconditioning triggered by carbon monoxide (CO) provides neuronal protection following perinatal hypoxia-ischemia. *PLOS ONE* **7(8)**:e42632 DOI [10.1371/journal.pone.0042632](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042632).
- Ryter SW, Alam J, Choi AM. 2006.** Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiological Reviews* **86(2)**:583–650 DOI [10.1152/physrev.00011.2005](https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2005).
- Ryter SW, Choi AM. 2016.** Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. *Translational Research* **167(1)**:7–34 DOI [10.1016/j.trsl.2015.06.011](https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.06.011).
- Sadler KC, Yüce O, Hamaratoglu F, Vergé V, Peaucellier G, Picard A. 2004.** MAP kinases regulate unfertilized egg apoptosis and fertilization suppresses death via Ca²⁺ signaling. *Molecular Reproduction and Development* **67(3)**:366–383 DOI [10.1002/mrd.20023](https://doi.org/10.1002/mrd.20023).

- Salvesen GS, Dixit VM. 1997. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91(4):443–446 DOI 10.1016/S0092-8674(00)80430-4.
- Schallner N, Fuchs M, Schwer CI, Loop T, Buerkle H, Lagrèze WA, Van Oterendorp C, Biermann J, Goebel U. 2012. Postconditioning with inhaled carbon monoxide counteracts apoptosis and neuroinflammation in the ischemic rat retina. *PLOS ONE* 7(9):e46479 DOI 10.1371/journal.pone.0046479.
- Sedmíková M, Petr J, Dörflerová A, Nevorál J, Novotná B, Krejčová T, Chmelíková E, Tůmová L. 2013. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase (JNK) suppresses porcine oocyte ageing *in vitro*. *Czech Journal of Animal Science* 58:535–545.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ. 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 276(10):7320–7326 DOI 10.1074/jbc.M008363200.
- Szollosi D. 1971. Morphological changes in mouse eggs due to aging in the fallopian tube. *American Journal of Anatomy* 130(2):209–225 DOI 10.1002/aja.1001300207.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9(3):231–241 DOI 10.1038/nrm2312.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2(61):748–755.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. 1969. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 23(244):6388–6394.
- Tůmová L, Petr J, Žalmanová T, Chmelíková E, Kott T, Tichovská H, Kučerová-Chrpová V, Hošková K, Jílek F. 2013. Calcineurin expression and localisation during porcine oocyte growth and meiotic maturation. *Animal Reproduction Science* 141(3–4):154–163 DOI 10.1016/j.anireprosci.2013.07.011.
- Turkseven S, Drummond G, Rezzani R, Rodella L, Quan S, Ikehara S, Abraham NG. 2007. Impact of silencing HO-2 on EC-SOD and the mitochondrial signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry* 100(4):815–823 DOI 10.1002/jcb.21138.
- Wang XL, Liu HR, Tao L, Liang F, Yan L, Zhao RR, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL. 2007b. Role of iNOS derived reactive nitrogen species and resultant nitrative stress in leukocytes induced cardiomyocyte apoptosis after myocardial ischemia/reperfusion. *Apoptosis* 12(7):1209–1217 DOI 10.1007/s10495-007-0055-y.
- Wang X, Wang Y, Kim HP, Nakahira K, Ryter SW, Choi AM. 2007a. Carbon monoxide protects against hyperoxia-induced endothelial cell apoptosis by inhibiting reactive oxygen species formation. *Journal of Biological Chemistry* 282(3):1718–1726 DOI 10.1074/jbc.M607610200.
- Wang X, Wang Y, Lee SJ, Kim HP, Choi AM, Ryter SW. 2011. Carbon monoxide inhibits Fas activating antibody-induced apoptosis in endothelial cells. *Medical Gas Research* 1(1):Article 8 DOI 10.1186/2045-9912-1-8.
- Wu L, Wang R. 2005. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacological Reviews* 57(4):585–630 DOI 10.1124/pr.57.4.3.
- Xu Z, Abbott A, Kopf GS, Schultz RM, Ducibella T. 1997. Spontaneous activation of ovulated mouse eggs: time-dependent effects on M-phase exit, cortical

granule exocytosis, maternal messenger ribonucleic acid recruitment, and inositol 1,4,5-trisphosphate sensitivity. *Biology of Reproduction* **57**(4):743–750 DOI [10.1095/biolreprod57.4.743](https://doi.org/10.1095/biolreprod57.4.743).

- Yoshida T, Kikuchi G. 1978.** Purification and properties of heme oxygenase from pig spleen microsomes. *The Journal of Biological Chemistry* **253**(12):4224–4229.
- Zenclussen ML, Jensen F, Rebelo S, El-Mousleh T, Casalis PA, Zenclussen AC. 2012.** Heme oxygenase-1 expression in the ovary dictates a proper oocyte ovulation, fertilization, and corpora lutea maintenance. *American Journal of Reproductive Immunology* **67**(5):376–382 DOI [10.1111/j.1600-0897.2011.01096.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01096.x).
- Zhang X, Shan P, Alam J, David RJ, Flavell RA, Lee PJ. 2003a.** Carbon monoxide modulates Fas/Fas ligand, caspases, and Bcl-2 family proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway during ischemia-reperfusion lung injury. *Journal of Biological Chemistry* **278**(24):22061–22070 DOI [10.1074/jbc.M301858200](https://doi.org/10.1074/jbc.M301858200).
- Zhang X, Shan P, Otterbein LE, Alam J, Flavell RA, David RJ, Choi AM, Lee PJ. 2003b.** Carbon monoxide inhibition of apoptosis during ischemia-reperfusion lung injury is dependent on the p38 mitogen-activated protein kinase pathway and involves caspase 3. *Journal of Biological Chemistry* **278**(2):1248–1258 DOI [10.1074/jbc.M208419200](https://doi.org/10.1074/jbc.M208419200).
- Zhu J, Lin FH, Zhang J, Lin J, Li H, Li YW, Tan XW, Tan JH. 2016.** The signaling pathways by which the Fas/FasL system accelerates oocyte aging. *Aging* **8**(2):291–303 DOI [10.18632/aging.100893](https://doi.org/10.18632/aging.100893).
- Zhu J, Zhang J, Li H, Wang TY, Zhang CHX, Luo MJ, Tan JH. 2015.** Cumulus cells accelerate oocyte aging by releasing soluble Fas Ligand in mice. *Scientific Reports* **5**:8683 DOI [10.1038/srep08683](https://doi.org/10.1038/srep08683).

Review Article

Heme oxygenase/carbon monoxide in the female reproductive system: an overlooked signalling pathway

David Němeček, Markéta Dvořáková, Markéta Sedmíková

Department of Veterinary Sciences, Czech University of Life Sciences, Prague, Czech Republic

Received August 30, 2016; Accepted November 23, 2016; Epub January 15, 2017; Published January 30, 2017

Abstract: For a long time, carbon monoxide (CO) was known for its toxic effect on organisms. But there are still many things left to discover on that molecule. CO is formed directly in the body by the enzymatic activity of heme oxygenase (HO). CO plays an important role in many physiological processes, such as cell protections (against various stress factors), and the regulation of metabolic processes. Recent research proves that CO also operates in the female reproductive system. At the centre of interest is the importance of CO for gestation. During the gestation period, CO is an important element affecting the proper function of the feto-placental unit and generally affects fetal survivability rates. Gestation is one of the most important processes of successful reproduction, although there are more relevant processes that need to be researched. While already proven that CO influences steroidogenesis and the corpus luteum survivability rate, our knowledge concerning the function and importance of CO in the reproductive system is still relatively limited. As an example, our knowledge of CO function in an oocyte, the most important cell for reproduction, is almost non-existent. The aim of this review is to summarize our current knowledge concerning the function of CO in the female reproductive system.

Keywords: Carbon monoxide, heme oxygenase, reproduction, oocyte, gestation

Introduction

For decades, only peptides, proteins, lipid derivatives and nucleic acid were considered factors regulating physiological functions. Gaseous molecules, except for oxygen, were considered unimportant. In the eighties it was demonstrated that the factor responsible for vascular smooth muscle cell relaxation (endothelial cell derived relaxing factor, EDRF) is nitric oxide (NO) [1, 2]. The significance of the discovery of the nitric oxide signalling-function had a huge impact on biomedical research. Soon after proving the signalling function of NO, it was discovered that carbon monoxide (CO) also has an important role in the proper function of the organism.

The fact that the organism produces CO as a by-product of heme degradation catalysed by the microsomal enzyme heme oxygenase (HO) was known long before the discovery of the NO signalling function [3, 4]. Endogenously produced CO was considered only a waste prod-

uct, with negative effects in high concentrations [5]. Shortly after the demonstration of the NO signalling function, the understanding of CO's importance to the organism changed, because the physiological role of CO in neurotransmission [6] and the relaxation of the anal sphincter [7] was identified.

Recently it was discovered that low levels of CO are an important factor for the proper functioning of the body. It is now known that the HO/CO system regulates many cellular functions and contributes to cellular protection from the negative effects of stress [8]. Problems in the function of the HO/CO system lead to health complications and even reproductive failure. However, the significance of HO/CO in reproduction is not yet fully understood.

Endogenous production of CO

The reaction catalysed by HO is the main endogenous source of CO. HO catalyses first and is the rate-limiting step in the oxidative degradation of heme [3, 4] (**Figure 1**).

HO/CO in the female reproductive system

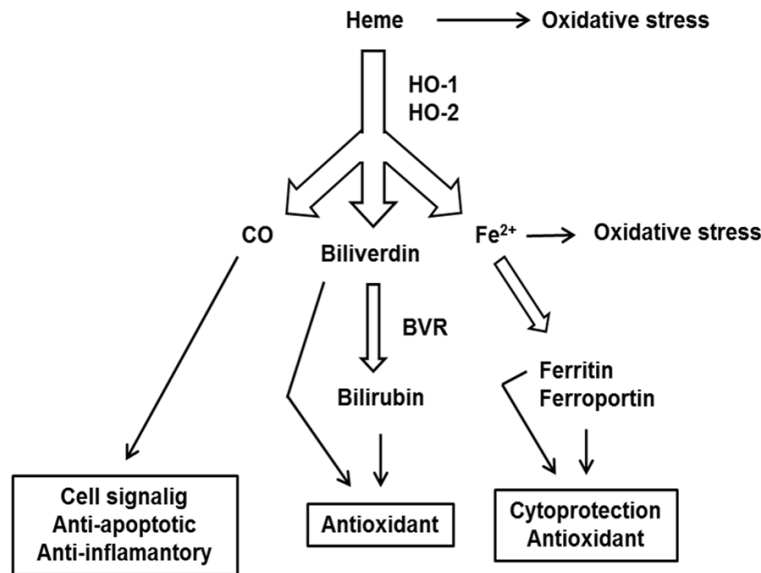


Figure 1. HO catabolic reactions. Both HO isoforms catalyse the oxidative degradation of heme, giving rise to CO, Fe²⁺ and biliverdin. Biliverdin is subsequently reduced to bilirubin by the enzyme biliverdin reductase (BVR). Excess of heme and Fe²⁺ induces oxidative stress. Each product of heme catabolism has a different function in the cell. CO influences a variety of signalling pathways, generally has cytoprotective, antiapoptotic and anti-inflammatory properties. Biliverdin and bilirubin are important antioxidants. Free Fe²⁺ induces the expression of ferritin and ferroportin, which remove redox-active Fe²⁺.

There are two known isoforms of HO, HO-1 and HO-2. Both catalyse identical biochemical reactions of heme transformation to biliverdin-IX α . Both proteins contain a highly conserved sequence of 24 amino acids, which are considered to be a binding site for heme [9, 10] and both isoforms share a similar hydrophobic region, which serves for the membrane attachment [11, 12]. However, both isoforms differ in their enzyme kinetics, thermostability and immunoreactivity [13].

Inducible isoform HO-1 (~32 kDa) is a protein attached to the endoplasmic reticulum membrane [14]. In response to stressors, changes in HO-1 location may occur, because HO-1 is translocated to lipid rafts (caveolae), mitochondria and nucleus [15]. Redistribution of HO-1 has a signal function, e.g. in the nucleus it is involved in the regulation of transcription factors (e.g. nuclear factor erythroid 2-related factor 2), and in cell protection against oxidative stress [16].

Under physiological conditions, HO-1 is mainly expressed in tissues which participate in the degradation of erythrocytes, such as the spleen

or bone marrow. In other tissues, the level of HO-1 is usually low, but its expression can be stimulated by a wide range of stressors (e.g. oxidative and thermal stress and hypoxia), the increased expression of which has a cytoprotective effect [17].

Induction of HO-1 expression is controlled by several signalling pathways, e.g. mitogen-activated protein kinases (MAPK) or nuclear factor κ B [18]. Also the enzymatically inactive form of HO-1 has an ability to suppress oxidative stress [19]. The mechanism of action of enzymatically inactive HO-1 is not yet fully understood, but it is known that HO-1 can directly bind to other proteins and thereby alter their activity [20].

HO-2 (~32 kDa) is a constitutively expressed isoform with its highest expression in the brain and testes [10]. Similarly to HO-1, HO-2 is also bound to the endoplasmic reticulum membrane. HO-2 can also be localised in outer nuclear membranes [21] and endosomes [22]. HO-2 does not respond to transcriptional activation by stress factors, and the only known activators of HO-2 gene expression are glucocorticoids [10, 23]. HO-2 is responsible for the stable production of CO and creates a barrier against cell damage e.g. by oxidative stress [24]. It is assumed that HO-2 also operates as an oxygen level sensor that is involved in the protective response of cells to hypoxia [25].

HO-3 was an additionally described isoform besides HO-1 and HO-2. However, HO-3 is probably not expressed in an *in vivo* condition and, due to the high homology of HO-3 and HO-2 and lack of introns in the HO-3 gene, HO-3 is accepted as a pseudogene from the HO-2 transcript [26].

HO/CO signalling pathway

Carbon monoxide affects cell function by binding structures containing transition metals (e.g. Fe, Cu) [27], of which the best known is heme.

HO/CO in the female reproductive system

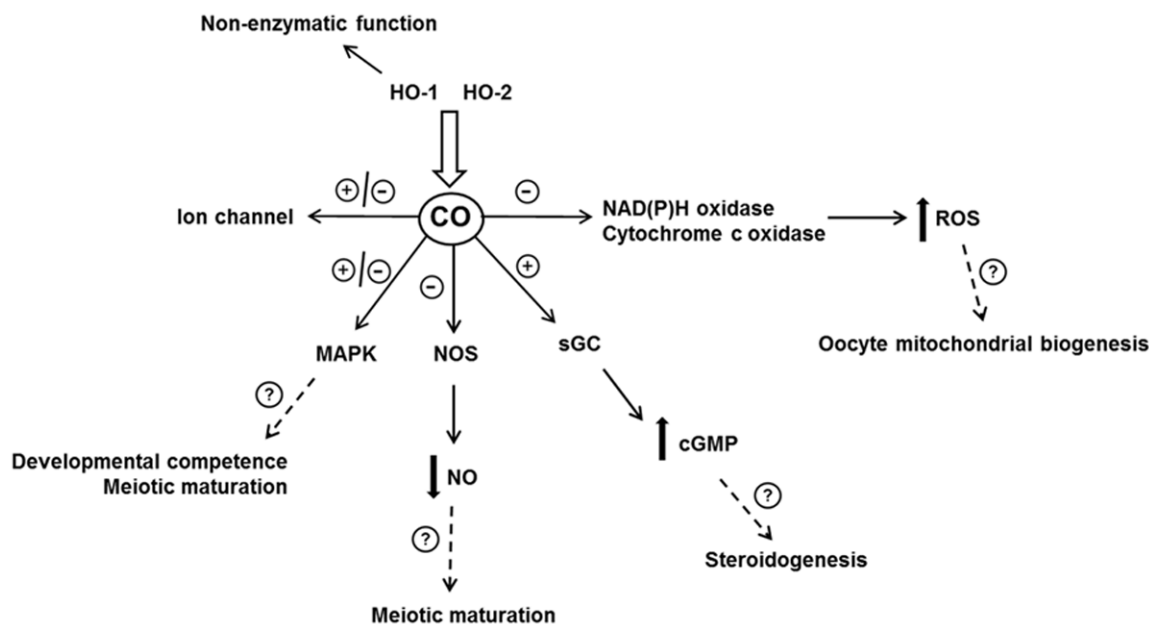


Figure 2. HO/CO signaling pathway. In the cell, HO/CO acts through several mechanisms. Besides catalytic function, HO has also a non-enzymatic function. Binding of HO to other protein (e.g. transcription factors) modulate their activity. CO operates through activation/inhibition of several pathways. By modulation of these pathways CO could affect various function of the female reproductive system, for example functions in relation to the oogenesis. See text for details.

A large number of proteins (e.g. soluble guanylyl cyclase (sGC), cyclooxygenase, cytochrome P450, cytochrome c oxidase, inducible nitric oxide synthase (iNOS)) contain the heme molecule and hence there is also a wide range of potential targets for CO [28]. Conformational changes occur after the binding of CO to ferrous ion in hemoprotein [29]. **Figure 2** summarize HO/CO signalling pathway.

Soluble guanylyl cyclase is a common target for CO and NO. Binding of CO or NO to the heme group of sGC leads to increased formation of 3',5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP). A change in cGMP levels consequently affects signalling pathways [30, 31]. CO is involved in regulation of vascular tone and neurotransmission through the sGC/cGMP signalling pathway [17].

In the case of NO in the reproductive system, e.g. NO by sGC/cGMP signalling pathway inhibits ovarian steroidogenesis [32, 33] and contributes to the maintenance of oocytes at the first meiotic block [34]. To date, there are no known sGC/cGMP mediated effects of CO on the female reproductive system, but e.g. because it is known that HO/CO affect steroido-

genesis [35], this CO effect may be mediated through sGC/cGMP. However, CO is a considerably weaker sGC activator compared with NO and therefore CO is considered rather an endogenous modulator of the NO/sGMP signalling pathway [30, 36].

The interaction between CO and NO not only takes place in the competitive binding to effector proteins, but also in the direct regulation of NOS or HO activity. Binding of CO to the heme group of iNOS leads to reduced iNOS activity and hence to the reduced production of NO [37]. On the other hand, NO increases the expression of HO [38]. Due to the interaction between HO/CO and NO/NOS, CO is considered as a feedback inhibitor of NOS that reduces the overproduction of NO and the associated oxidative stress. Changes in NO levels regulate oocyte meiotic maturation.

The correct course of meiotic maturation is crucial for the formation of fertilisable and developmentally competent oocytes. Low levels of NO stimulate meiotic maturation and, conversely, high levels of NO maintain meiotic block and further lead to developmental disorders [39, 40]. The HO/CO system may be a con-

HO/CO in the female reproductive system

troller of oocyte NO levels and therefore also a regulator of meiotic maturation. However, this possibility still awaits clarification.

CO increases ROS production by binding to mitochondrial cytochrome c oxidase and/or to the plasma membrane NAD(P)H oxidase. Low levels of ROS produced in this way act as an important second messenger [41]. Electron leaks from the electron transport chain with the subsequent ROS formation are caused by binding of CO to cytochrome c oxidase. ROS can then affect different signalling pathways [42, 43].

CO-induced ROS inhibits smooth muscle cells' proliferation through inhibition of ERK 1/2 kinases and by reducing the expression of cyclin D [43]. In addition, for example, CO-induced ROS increases mitochondria biogenesis via activation of transcription factors' nuclear respiratory factor-1 (Nrf-1), Nrf-2 and gamma-coactivator-1 α . Mitochondrial biogenesis allows cells to replace damaged mitochondria and cope with periods of increased metabolic demands [44, 45]. In the case of oocyte, the reduced number of mitochondria is associated with decreased fertilisation ability [46].

The question arises whether the exogenous application of CO could improve fertilisation percentages through ROS/mitochondrial biogenesis. The answer still awaits clarification. The overall effect of a temporary slight increase of ROS production is positive, because it initiates a series of processes, such as induction of antioxidant enzymes and activation of cytoprotective genes. This leads to the overall increase in cell resistance against the effects of stressors [47]. ROS are also involved in the regulation of the meiotic cycle. The slight increase in ROS levels promotes meiotic maturation and, conversely, the cell-permeable antioxidants inhibit meiotic maturation [48]. It is necessary to clarify whether CO affects meiotic maturation.

It is proven that CO acts on cell function through MAPK (p38, ERK 1/2 and JNK). Modulation of the MAPK signalling pathway via CO is responsible for cytoprotective, anti-inflammatory, anti-apoptotic and anti-proliferative properties of CO [17, 49, 50]. Because the CO is unable to directly bind to MAPK protein, it must influence MAPK activity via other proteins or signalling pathways. For example, in the case of p38, it is

assumed that CO up-regulates p38 by transient increase of ROS level [51] and/or via the sGC/cGMP signalling pathway [52].

In mammalian oocyte, the p38 is involved in spindle apparatus assembly and function, whereby defects in spindle apparatus lead to cell cycle arrest [53]. p38 is also involved in maintenance of the second meiotic block [54]. In the case of *in vitro* conditions, it is demonstrated that transient delay of meiotic maturation resumption leads to improved developmental competence [55, 56]. In accordance with those facts, CO could be a promising regulator of meiotic maturation.

The functions of a wide variety of ion channels for K⁺, Na⁺ and Ca²⁺ are regulated by CO. Activation or inhibition of ion channels via CO regulates various physiological functions. For example, CO causes vasodilation by increasing activity of large conductance calcium-activated potassium channels (BK_{Ca}) and has neuroprotective effects due to inhibition of potassium voltage-gated channel subfamily B member 1 (KCNB1) [57, 58].

In the uterine muscle, BK_{Ca} contributes to the maintenance of uterine quiescence during pregnancy, and CO is also important in the transition to a more contractile state at the onset of labour [59]. CO, through activation of BK_{Ca} may contribute to the maintenance of pregnancy as well as regulate the onset of labour.

HO/CO and the female reproductive system

The presence of HO is demonstrated in the ovaries [35], uterus and placenta [60-62], in which the distribution of isoforms differs according to the cell type. In the ovary, both isoforms are localised in the corpus luteum (CL) and follicular cells. In the ovarian stroma, only HO-2 is present [35, 63, 64]. The presence of HO-1 mRNA is shown in mice oocytes [65]. In porcine oocytes, HO-1 mRNA as well as HO-2 mRNA and also HO-1 and HO-2 proteins are localised (our unpublished results).

In the ovaries and uterus, as well as in other tissues, exposure to stressors (e.g. oxidative stress, excessive accumulation of free heme) leads to the increased expression of HO-1 [63, 66-68]. Expression of HO is also affected by changes in hormone levels and, therefore, expression of HO fluctuates during the oestrous

HO/CO in the female reproductive system

Table 1. The female reproductive system functions which may have relationship with HO/CO based on so far published results. The table does not include functions related to pregnancy

Processes	References
Steroidogenesis	35, 67-69, 70, 74, 95
CL maintenance	74
Oestrous cycle	35, 68, 70, 74, 80
Ovulation	74
Fertilization ability	74
Protection against stress factors	74, 79, 80
Function granulosa cells	64, 79

cycle and pregnancy. In the uterus, HO-1 expression positively correlates with increased levels of oestrogens and progesterone. Expression of HO-2 positively correlates only with a level of progesterone [67-69].

During the mouse oestrous cycle, significant increase in expression of HO-1 occurs in the oestrus phase, when a surge of progesterone occurs [68]. If HO activity is inhibited by HO inhibitor chromium mesoporphyrin (CrMP), there is a significantly reduced occurrence of the oestrus phase of the oestrous cycle [70]. The reason for the increased expression of HO-1 in the uterus is probably to protect the embryo from an excess of free heme and an improper inflammatory response, as both processes have proven deleterious effects [68, 71, 72]. This assumption is confirmed by the fact that the increased expression of HO-1 in the uterus correlates with a decrease in the level of free heme. For these reasons, HO-1 activity is considered as crucial for the maintenance of an optimal environment for nidation and implantation [68].

Changes in HO activity during the oestrous cycle can affect the development and survival of follicles. In the ovaries, activation of inflammatory processes and the release of heme are associated with ovulation [71, 73] and, as well as in the uterus, an increase of HO-1 activity may lead to protection against excessive development of these harmful processes in the ovaries and in the oestrus phase of the oestrous cycle [72, 74]. Indeed, in the case of HO-1-deficient mice, the decreased production of oocytes is demonstrated, which indicates a disturbance in the process of ovulation.

Oocytes obtained from HO-1-deficient mice have decreased fertilisation ability after *in vitro* fertilisation. Increased level of CL cell apoptosis also occurs in HO-1-deficient mice [74] when such an increase leads to a decreased ability to produce progesterone [75]. Decreased production of progesterone is also observed in case HO activity is inhibited by CrMP [35]. Up-regulation of HO-1 leads to an increased production of CO [76] that may subsequently activate the signalling pathway with cytoprotective effects [8]. Conversely, the state of HO-1 deficiency leads to the decreased production of CO [77], causing increased apoptosis [78]. The HO/CO pathway is therefore important in preventing functional disturbances of the ovary.

Fully functional granulosa cells surrounding oocyte are important for the development of the ability of oocyte to be fertilised. The rate of HO expression fluctuates along with the state of granulosa cells. In healthy follicles, there is a low level of HO-1 expression, but the level of HO-1 expression significantly increases in atretic follicles [64]. In the case of HO-2, there is an opposite trend in the level of expression. In healthy follicles, a significant level of HO-2 expression is detected, but in atretic follicles, it is low. High levels of HO-1 expression in granulosa cells from atretic follicles are considered to be a consequence of the action of stress factors [64]. The fact that the action of stressors leads to an increased level of HO-1 expression is often used as a marker for the exposure of cells to e.g. oxidative stress.

Bergandi *et al.* [79] used the level of HO-1 expression in combination with the level of iNOS expression as a marker of oocytes' competence to be fertilised. In cumulus cells from unfertilised oocytes, a higher level of expression of both HO-1 and iNOS was observed. The authors explain the results as that of oxidative stress affecting granulosa cells, causing an increased level of HO-1 and iNOS expression, as well as the decreased fertilisation ability of oocyte. Pfeiffer *et al.* [65] also used HO-1 as one of the markers whose differential content size in the oocyte may affect the quality of embryos.

The importance of HO for the proper function of female reproductive organs is obvious (**Table 1**) summarize the female reproductive functions which may have relationship with HO/CO) and

HO/CO in the female reproductive system

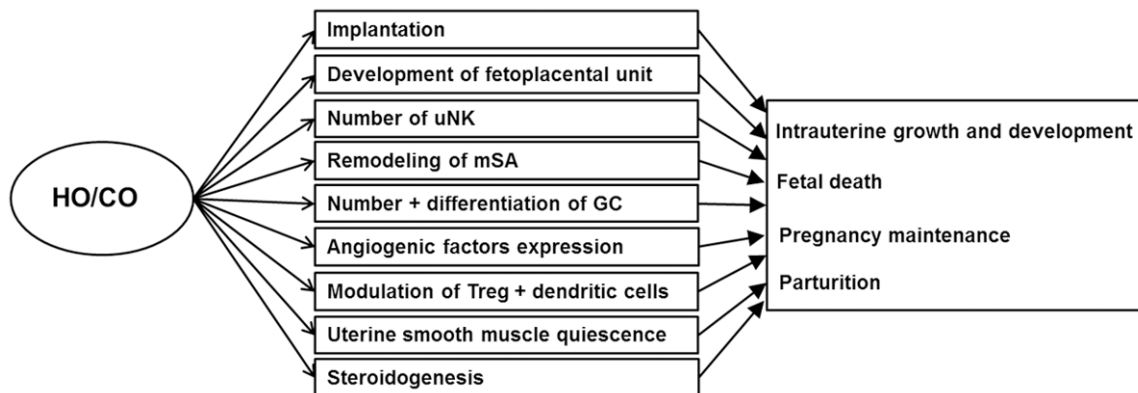


Figure 3. Significance of HO/CO during pregnancy. Full-fledged intrauterine development and subsequent parturition is result from interplay of many processes. It is proved that HO/CO is important for the right function of many processes influencing the intrauterine development. See text for details.

therefore the question arises whether exogenous HO up-regulation or CO delivery could have a positive effect. Clinical application in treatment of e.g. the various inflammatory conditions in the body is now being intensively studied [17]. The relationship between HO activity and steroidogenesis is supported by several works.

Application of hemin (HO activator) to rats leads to increased synthesis of androstenedione and oestradiol. Treatment by an HO inhibitor leads to reduced synthesis of progesterone and androstenedione. The synthesis of oestrogens remains unchanged. The reason for various changes in steroidogenesis may be a different mode of action of HO/CO on different steroidogenesis pathways. Together with changes in hormone levels after the application of an HO inhibitor, changes in the oestrous cycle also occur simultaneously, leading to shortened length of the oestrus phase of the oestrous cycle [35, 70].

In contrast, HO-1 deficiency in mice does not lead to changes in the level of progesterone or oestrogens during pregnancy. Although increased activity of HO (HO-1 isoform) occurs during the oestrous cycle in response to oestrogens, HO-1 deficiency in mice simply does not affect levels of sex hormones [80]. The possible reason for the various effects of HO-1 deficiency and HO inhibitor may be that CrMP is a nonspecific inhibitor of both HO isoforms. Also, the significance of HO-1 during the oestrous cycle or pregnancy may vary. In fact, HO-1 deficiency enhances apoptosis of the CL cell, also

suggesting a reduced ability to produce progesterone [74].

However, it is unlikely that modulation of HO activity would be used as an effective method of affecting the oestrous cycle. In accordance with the fact that the formation of oocyte which is fertilisable and developmentally competent is essential for reproduction, the question arises whether it would be possible to influence oocyte quality by modulating HO activity.

Role of HO/CO during pregnancy

For the successful development of the fetus, it is necessary for hemodynamic and immune changes to occur during pregnancy. If these changes do not occur correctly, the risk of failures in feto-maternal communication and connection is increased. Finally, these complications result in impaired fertility. Compared with other processes of the female reproductive system, the HO/CO system is best studied in pregnancy and several reviews summarize the link between HO/CO and pregnancy [81-85]. **Figure 3** summarizes significance of HO/CO during pregnancy.

Localisation of the HO isoform is different in distinct placental cell types [67, 82]. In human placenta, HO-1 is mainly localised in syncytiotrophoblast. Conversely, in cytotrophoblast a smaller amount is found. Syncytiotrophoblast is directly exposed to maternal blood and hence a potential immunological reaction or inflammatory stress. Inducible HO-1 located in the syncytiotrophoblast can therefore directly respond to these processes [86].

HO/CO in the female reproductive system

Changes in HO expression occur in response to various pathologies of pregnancy. Both spontaneous and artificially induced mice abortions are associated with reduced expression of HO [87, 88]. Reduced HO expression also occurs in the pathologies of pregnancy such as pre-eclampsia, fetal growth retardation or H-mole [89, 90]. Although it is unclear whether decreased HO expression triggers pathology or is merely an accompanying signal, it is clearly demonstrated that HO/CO is crucial for the normal course of pregnancy.

HO-1 deficiency is associated with infertility [91], but in HO-1^{-/-} mice, it is shown that in fact conception occurs, but all fetuses die *in utero* [80]. Also, the inhibition of both HO isoforms by CrMP leads to fetal intrauterine deaths [70]. Already partial HO-1 deficiency (HO-1^{+/-}) leads to an increased fetal loss and hence smaller litter size [80, 92].

Implantation is a process in which HO-1 has an important role. HO-1 deficiency in mice leads to delayed establishment of a connection between blastocyst and uterine epithelial cells [80]. Delayed implantation has a negative impact on placentation, development of the fetal-placental unit and subsequent fetal growth [93]. HO-1 deficiency leads to an overall reduction in weight of the fetal-placental unit. Disturbances in placental function lead to intrauterine fetal growth restriction (IUGR) and the low birth weight of successfully derived offspring [80, 92, 94, 95].

HO-1 is important during placentation for the survivability of trophoblast and also for trophoblast differentiation into mature phenotype. Differentiation of trophoblastic stem cells to the so-called giant cells (GCs) takes place during placentation. HO inhibition by nonspecific inhibitor zinc protoporphyrin (ZnPP) affects this process, because it reduces the trophoblastic stem cells' viability and also suppresses their differentiation into GCs. Also placenta from HO-1-deficient mice shows a reduced number of GCs and an increased rate of apoptosis.

The ability to reverse this negative effect by CO exogenous application indicates the significance of CO [80, 92]. If CO is applied to HO-1-deficient mice, positive changes take place in placenta, such as placental enlargement, increased amount of GC, reduced pathological

changes and decreased fetal mortality [80, 82].

During pregnancy, there is a significant increase of blood flow in the uteroplacental junction, which is facilitated by the growth and remodeling of the maternal spiral uterine artery (SA) system [84]. Uterine natural killer cells (UNKs) are important cells that regulate remodeling of maternal uterine vasculature [96]. In placenta of HO-1-deficient mice, a smaller number of UNKs and lower expression of cytokine IL-15 are detected, which is important for UNKs' differentiation and their retention in the fetoplacental junction. The reduced quantity of UNKs is associated with a decrease in production of angiogenic factors [94, 97] and an increase in synthesis of anti-angiogenic factors [98].

Overall, HO-1 deficiency leads to a significant deterioration in SA remodeling, reduced size of fetoplacental unit and IUGR [94, 97]. The negative effect of HO-1 deficiency may be reversed by exogenous CO application, which leads to an increase of UNK number, production of angiogenic factors and normalisation of fetoplacental unit size [94]. For these reasons, the overall significance of the HO/CO system for the proper course of gestation is obvious.

Modulation of regulatory T cells (Treg) and dendritic cells is an important mechanism by which HO-1 protects the fetus against abortion. HO-1 is involved in the maintenance of dendritic cells in an immature state (tolerogenic), which is important for the protection of the fetus against harmful immune responses. HO-1 inhibition by ZnPP leads to a decreased amount of Treg in the fetoplacental junction, which leads to fetal allograft rejection. On the other hand, up-regulation of HO-1 by CoPP maintains tolerogenic dendritic cells and leads to an increased Treg quantity, thereby preventing fetal allograft rejection [99-101].

On the basis of the aforementioned works, we may consider the possibility of using the HO/CO system in the treatment/prevention of pregnancy disorders. Activation of HO-1 or exogenous CO application, leads to a decrease in fetal deaths [80, 102] and has a positive effect on fetal growth [80, 103]. The HO/CO system may also participate in fetal protection against the harmful effects of pathogens. *Listeria monocytogenes* infection leads to reduced

HO-1 expression and, conversely, exogenous induction of HO-1 by cobalt protoporphyrin (CoPP) results in the inhibition of the onset of abortion [104]. A similar effect is also found in the case of *Brucella abortus* infection, when the application of CoPP also suppresses abortion [105].

Conclusion and future perspectives

Deleterious processes, such as oxidative stress or inflammatory reaction, result in disorders of the reproductive system. HO/CO belongs to the signalling pathways that are involved in protecting cells from these processes. Methods of assisted reproduction and reproduction biotechnology are connected to *in vitro* conditions, which, in comparison to *in vivo* conditions, are more stressful for cells.

Consequently, this leads to deterioration in the quality of gametes and embryos. HO/CO could prevent this deterioration by activation of cytoprotective mechanisms and thus improve the methods used thus far. Likewise, reduced function of HO/CO may impair reproduction and exogenous HO activation or CO supplementation could reverse the negative effect of HO deficiency.

Because of the significance of HO/CO in oogenesis being an unexplored area, there is a need to focus on this key reproductive process. In the case of H₂S and NO, it is known that these gasotransmitters are important for the course of meiotic maturation and the prevention of post-ovulatory aging. Gasotransmitters interact among themselves and therefore it is important to know the effect of CO. Only then is it possible to obtain a comprehensive view of the effect of gasotransmitters on oogenesis. Together with the evaluation of the effect of HO deficiency/activation or exogenous CO donation on the course of oogenesis, as well as overall reproduction, it is necessary to examine the cross-talk between CO/NO/H₂S.

A large portion of experiments is aimed only at HO-1. Despite the importance of HO-1, this is insufficient. HO-1 and HO-2 have a distinct significance, but they can also partially replace each other. Therefore, for the understanding of HO/CO significance, it is important to study both isoforms.

Acknowledgements

Supported by the Internal Grant Agency of the Czech University of Life Sciences, Prague (CIGA) (Project No. 20152022).

Disclosure of conflict of interest

None.

Address correspondence to: Markéta Sedmíková, Department of Veterinary Sciences, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, Prague 16500, Czech Republic. Tel: +420 22438 2933; E-mail: sedmikova@af.czu.cz

References

- [1] Palmer RJ, Ferrige AG and Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
- [2] Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM and Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 1987; 61: 866-879.
- [3] Tenhunen R, Marver HS and Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968; 61: 748-755.
- [4] Tenhunen R, Marver HS and Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1969; 244: 6388-6394.
- [5] Stewart RD. The effect of carbon monoxide on humans. *Annu Rev Pharmacol* 1975; 15: 409-423.
- [6] Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV and Snyder SH. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* 1993; 259: 381-384.
- [7] Rattan S and Chakder S. Inhibitory effect of CO on internal anal sphincter: Heme oxygenase inhibitor inhibits NANC relaxation. *Am J Physiol* 1993; 265: 799-804.
- [8] Wu L and Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 585-630.
- [9] Rotenberg MO and Maines MD. Characterization of a cDNA-encoding rabbit brain heme oxygenase-2 and identification of a conserved domain among mammalian heme oxygenase isozymes: possible heme-binding site? *Arch Biochem Biophys* 1991; 290: 336-344.
- [10] Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 517-554.

HO/CO in the female reproductive system

- [11] McCoubrey WK and Maines MD. Domains of rat heme oxygenase-2: the amino terminus and histidine 151 are required for heme oxidation. *Arch Biochem Biophys* 1993; 302: 402-408.
- [12] Shibahara S, Muller R, Taguchi H and Yoshida T. Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 7865-7869.
- [13] Maines MD, Trakshel GM and Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* 1986; 261: 411-419.
- [14] Yoshida T and Kikuchi G. Purification and properties of heme oxygenase from pig spleen microsomes. *J Biol Chem* 1978; 253: 4224-4229.
- [15] Dunn LL, Midwinter RG, Ni J, Hamid HA, Parish CR and Stocker R. New insights into intracellular locations and functions of heme oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20: 1723-1742.
- [16] Biswas C, Shah N, Muthu M, La P, Fernando AP, Sengupta, S, Zang G and Dennery PA. Nuclear heme oxygenase-1 (HO-1) modulates subcellular distribution and activation of Nrf2, impacting metabolic and anti-oxidant defenses. *J Biol Chem* 2014; 289: 26882-26894.
- [17] Ryter SW and Choi AK. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. *Transl Res* 2016; 167: 7-34.
- [18] Kim YM, Pae HO, Park JE, Lee YC, Woo JM, Kim NH, Choi YK, Lee BS, Kim SR and Chung HT. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14: 137-167.
- [19] Hori R, Kashiba M, Toma T, Yachie A, Goda N, Makino N, Soejima A, Nagasawa T, Nakabayashi K and Suematsu M. Gene transfection of H2SA mutant heme oxygenase-1 protects cells against hydroperoxide-induced cytotoxicity. *J Biol Chem* 2002; 277: 10712-10718.
- [20] Dennery PA. Signaling function of heme oxygenase proteins. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20: 1743-1753.
- [21] Ma N, Ding X, Doi M, Izumi N and Semba R. Cellular and subcellular localization of heme oxygenase-2 in monkey retina. *J Neurocytol* 2004; 33: 407-415.
- [22] West AR and Oates PS. Subcellular location of heme oxygenase 1 and 2 and divalent metal transporter 1 in relation to endocytotic markers during heme iron absorption. *J Gastroen Hepatol* 2007; 23: 150-158.
- [23] Liu N, Wang X, McCoubrey WK and Maines MD. Developmentally regulated expression of two transcripts for heme oxygenase-2 with a first exon unique to rat testis: control by corticosterone of the oxygenase protein expression. *Gene* 2000; 241: 175-183.
- [24] Turkseven S, Drummond G, Rezzani R, Rodella L, Quan S, Ikehara S and Abraham NG. Impact of silencing HO-2 on EC-SOD and the mitochondrial signaling pathway. *J Cell Biochem* 2007; 100: 815-823.
- [25] Muñoz-Sánchez J and Cháñez-Cárdenas ME. A review on hemeoxygenase-2: focus on cellular protection and oxygen response. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 604981.
- [26] Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y and Noguchi M. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 2004; 336: 241-250.
- [27] Boczkowski J, Poderoso JJ and Motterlini R. CO-metal interaction: vital signaling from a lethal gas. *Trends Biochem Sci* 2006; 31: 614-621.
- [28] Tsiftoglou AS, Tsamadou AI and Papadopoulou LC. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol Ther* 2006; 111: 327-345.
- [29] Roberts GP, Youn H and Kerby RL. CO-sensing mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68: 453-473.
- [30] Furchgott RF and Jothianandan D. Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 1991; 28: 52-61.
- [31] Stone JR and Marletta MA. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 1994; 33: 5636-5640.
- [32] Ishimaru R, Leung K, Hong L and LaPolt PS. Inhibitory effects of nitric oxide on estrogen production and cAMP levels in rat granulosa cell cultures. *J Endocrinol* 2001; 168: 249-255.
- [33] Grasselli F, Ponderato N, Basini G and Tamanini C. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide/cyclic GMP pathway in swine granulosa cells. *Domest Anim Endocrin* 2001; 20: 241-252.
- [34] Schwarz KR, Pires PR, Mesquita LG, Chiaratti MR and Leal CL. Effect of nitric oxide on the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway during meiosis resumption in bovine oocytes. *Theriogenology* 2014; 81: 556-564.
- [35] Alexandreanu IC and Lawson DM. Heme oxygenase in the rat ovary: immunohistochemical localization and possible role in steroidogene-

- sis. *Exp Biol Med* (Maywood) 2003; 228: 59-63.
- [36] Ingi T, Cheng J and Ronnett GV. Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. *Neuron* 1996; 16: 835-842.
- [37] Kim HS, Loughran PA and Billiar TR. Carbon monoxide decreases the level of iNOS protein and active dimer in IL-1 β -stimulated hepatocytes. *Nitric Oxide* 2008; 18: 256-265.
- [38] Motterlini R, Green CJ and Foresti R. Regulation of heme oxygenase-1 by redox signals involving nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 615-624.
- [39] Bu S, Xia G, Tao Y, Lei L and Zhou B. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 207: 21-30.
- [40] Tichovská H, Petr J, Chmelíková E, Sedmíková M, Tůmová L, Krejčová M, Dorflerová A and Rajmon R. Nitric oxide and meiotic competence of porcine oocytes. *Animal* 2011; 5: 1398-1405.
- [41] Bilban M, Haschemi A, Wegiel B, Chin BY, Wagner O and Otterbein LE. Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling. *J Mol Med* 2008; 86: 267-279.
- [42] D'Amico G, Lam F, Hagen T and Moncada S. Inhibition of cellular respiration by endogenously produced carbon monoxide. *J Cell Sci* 2006; 119: 2291-2298.
- [43] Taillé C, El-Benna J, Lanone S, Boczkowski J and Motterlini R. Mitochondrial respiratory chain and NAD(P)H oxidase are targets for the antiproliferative effect of carbon monoxide in human airway smooth muscle. *J Biol Chem* 2005; 280: 25350-25360.
- [44] Piantadosi CA, Carraway MS, Babiker A and Suliman HB. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ Res* 2008; 103: 1232-1240.
- [45] Suliman HB, Carraway MS, Tatro LG and Piantadosi CA. A new activating role for CO in cardiac mitochondrial biogenesis. *J Cell Sci* 2007; 120: 299-308.
- [46] Reynier P, May-Panloup P, Chretien MF, Morgan CJ, Jean M, Savagner F, Barrière P, Malthiery Y. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 425-429.
- [47] Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 248-253.
- [48] Combelles CH, Gupta S and Agarwal A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reprod Biomed Online* 2009; 18: 864-880.
- [49] Ryter SW, Alam J and Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 2006; 86: 583-650.
- [50] Kim HP, Ryter SW and Choi AK. Co as a cellular signaling molecule. *Annu Rev Pharmacol* 2006; 46: 411-449.
- [51] Bilban M, Bach FH, Otterbein SL, Ifedigbo E, Costa d'Avila J, Esterbauer H, Chin BY, Usheva A, Robson SC, Wagner O and Otterbein LE. Carbon monoxide orchestrates a protective response through PPAR γ . *Immunity* 2006; 24: 601-610.
- [52] Wang R, Wang Z, Wu L, Hanna ST and Peterson-Wakeman R. Reduced vasorelaxant effect of carbon monoxide in diabetes and the underlying mechanisms. *Diabetes* 2001; 50: 166-174.
- [53] Ou XH, Li S, Xu BZ, Wang ZB, Quan S, Li M, Zhang QH, Ouyang YC, Schatten H, Xing FQ and Sun QY. P38 α MAPK is a MTOC-associated protein regulating spindle assembly, spindle length and accurate chromosome segregation during mouse oocyte meiotic maturation. *Cell Cycle* 2014; 9: 4130-4143.
- [54] Miyagaki Y, Kanemori Y, Tanaka F and Baba T. Possible role of p38 MAPK-MNK1-EMI2 cascade in metaphase-II arrest of mouse oocytes. *Biol Reprod* 2014; 91: 45-53.
- [55] Nogueira D, Cortvrindt R, De Matos DG, Vanhoutte L and Smits J. Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on developmental competence of immature mouse oocytes in vitro. *Biol Reprod* 2003; 69: 2045-2052.
- [56] Vanhoutte L, Nogueira D, Gerris J, Dhont M and De Sutter P. Effect of temporary nuclear arrest by Phosphodiesterase 3-Inhibitor on morphological and functional aspects of in vitro matured mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 2008; 75: 1021-1030.
- [57] Wilkinson WJ and Kemp PJ. Carbon monoxide: an emerging regulator of ion channels. *J Physiol* 2011; 589: 3055-3062.
- [58] Peers C, Boyle JP, Scragg JL, Dallas ML, Al-Owais MM, Hettiarachichi NT, Elies J, Johnson E, Gamper N and Steele DS. Diverse mechanisms underlying the regulation of ion channels by carbon monoxide. *Brit J Pharmacol* 2015; 172: 1546-1556.
- [59] Lorca RA, Prabakaran M and England SK. Functional insights into modulation of BKCa channel activity to alter myometrial contractility. *Front Physiol* 2014; 5: 289.
- [60] Odrich MJ, Graham CH, Kimura KA, McLoughlin BE, Marks GS, Nakatsu K and Brien JF. Heme oxygenase and nitric oxide synthase in the placenta of the guinea-pig during gestation. *Placenta* 1998; 19: 509-516.

HO/CO in the female reproductive system

- [61] Ihara N, Akagi R, Ejiri K, Kudo T, Furuyama K and Fujita H. Developmental changes of gene expression in heme metabolic enzymes in rat placenta. *FEBS Lett* 1998; 439: 163-167.
- [62] Kreiser D, Kelly DK, Seidman DS, Stevenson DK, Baum M and Dennery PA. Gestational pattern of heme oxygenase expression in the rat. *Pediatr Res* 2003; 54: 172-178.
- [63] Murphy BJ, Laderoute KR, Short SM and Sutherland RM. The identification of heme oxygenase as a major hypoxic stress protein in Chinese hamster ovary cells. *Brit J Cancer* 1991; 64: 69-73.
- [64] Harada T, Koi H, Kubota T and Aso T. Haem oxygenase augments porcine granulosa cell apoptosis in vitro. *J Endocrinol* 2004; 181: 191-205.
- [65] Pfeiffer MJ, Taher L, Drexler H, Suzuki Y, Makalowski W, Schwarzer C, Wang B, Fuellen B and Boiani M. Differences in embryo quality are associated with differences in oocyte composition: a proteomic study in inbred mice. *Proteomics* 2015; 15: 675-687.
- [66] Maines MD and Kutty RK. Differential response of testicular and ovarian heme oxygenase activity to metal ions. *Arch Biochem Biophys* 1983; 226: 134-144.
- [67] Cella M, Farina MG, Keller Sarmiento MI, Chianelli M, Rosenstein RE and Franchi AM. Heme oxygenase-carbon monoxide (HO-CO) system in rat uterus: effect of sexual steroids and prostaglandins. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 99: 59-66.
- [68] Zenclussen ML, Casalis PA, Jensen F, Woidacki K and Zenclussen AC. Hormonal fluctuations during the estrous cycle modulate heme oxygenase-1 expression in the uterus. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; 5: 32.
- [69] Acevedo CH and Ahmed A. Hemeoxygenase-1 inhibits human myometrial contractility via carbon monoxide and is upregulated by progesterone during pregnancy. *J Clin Invest* 1998; 101: 949-955.
- [70] Alexandreanu IC and Lawson DM. Effects of chronic administration of a heme oxygenase substrate or inhibitor on progression of the estrous cycle, pregnancy and lactation of Sprague-Dawley rats. *Life Sci* 2002; 72: 153-162.
- [71] Vinatier D, Dufour P, Tordjeman-Rizzi N, Prolongeau JF, Depret-Moser S and Monnier JC. Immunological aspects of ovarian function: role of the cytokines. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995; 63: 155-168.
- [72] Li L, Tang J, Sun Y, Wu J, Yu P and Wang G. Upregulation of HO-1 attenuates LPS-stimulated proinflammatory responses through downregulation of p38 signaling pathways in rat ovary. *Inflammation* 2015; 38: 1085-1092.
- [73] Richards JS, Russell DL, Ochsner S and Espey LL. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol* 2002; 64: 69-92.
- [74] Zenclussen ML, Jensen F, Rebelo S, El-Mousleh T, Casalis PA and Zenclussen AC. Heme oxygenase-1 expression in the ovary dictates a proper oocyte ovulation, fertilization, and corpora lutea maintenance. *Am J Reprod Immunol* 2012; 67: 376-382.
- [75] Devoto L, Vega M, Kohen P, Castro O, Carvallo P and Palomino A. Molecular regulation of progesterone secretion by the human corpus luteum throughout the menstrual cycle. *J Reprod Immunol* 2002; 55: 11-20.
- [76] Vreman HJ, Zentner AR, Wong RJ and Stevenson DK. Carbon monoxide production and upregulation of heme oxygenase activity in mice after heme administration. *Pediatr Res* 1999; 4: 231A-231A.
- [77] Chen B, Guo L, Fan C, Bolisetty S, Joseph R, Wright MM, Agarwal A and George JF. Carbon monoxide rescues heme oxygenase-1-deficient mice from arterial thrombosis in allogeneic aortic transplantation. *Am J Pathol* 2009; 175: 422-429.
- [78] Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AK and Soares MP. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2000; 192: 1015-1026.
- [79] Bergandi L, Basso G, Evangelista F, Canosa S, Dalmasso P, Aldieri E, Revelli A, Benedetto C, Ghigo D. Inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase 1 are expressed in human cumulus cells and may be used as biomarkers of oocyte competence. *Reprod Sci* 2014; 21: 1370-1377.
- [80] Zenclussen ML, Casalis PA, El-Mousleh T, Rebelo S, Langwisch S, Linzke N, Volk HD, Fest S, Soares MP and Zenclussen AC. Haem oxygenase-1 dictates intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. *J Pathol* 2011; 225: 293-304.
- [81] Bainbridge SA and Smith GN. HO in pregnancy. *Free Radical Bio Med* 2005; 38: 979-988.
- [82] Levytska K, Kingdom J, Baczyk D and Drewlo S. Heme oxygenase-1 in placental development and pathology. *Placenta* 2013; 34: 291-298.
- [83] George EM and Granger JP. Heme oxygenase in pregnancy and preeclampsia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2013; 22: 156-162.
- [84] Zenclussen ML, Linzke N, Schumacher A, Fest S, Meyer N, Casalis PA, Zenclussen AC. Heme oxygenase-1 is critically involved in placentation, spiral artery remodeling, and blood pressure regulation during murine pregnancy. *Front Pharmacol* 2015; 5: 291.
- [85] Schumacher A and Zenclussen AC. Effects of heme oxygenase-1 on innate and adaptive im-

- mune responses promoting pregnancy success and allograft tolerance. *Front Pharmacol* 2015; 5: 288.
- [86] Yoshiki N, Kubota T and Aso T. Expression and localization of heme oxygenase in human placental villi. *Biochem Bioph Res Co* 2000; 276: 1136-1142.
- [87] Zenclussen AC, Joachim R, Hagen E, Peiser C, Klapp BF and Arck PC. Heme oxygenase is downregulated in stress-triggered and interleukin-12-mediated murine abortion. *Scand J Immunol* 2002; 55: 560-569.
- [88] Zenclussen AC, Sollwedel A, Zambon Bertoja AZ, Gerlof K, Zenclussen ML, Woiciechowsky C and Volk HD. Heme oxygenase as a therapeutic target in immunological pregnancy complications. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 41-51.
- [89] Zenclussen AC, Lim E, Knoeller S, Knackstedt M, Hertwig K, Hagen E, Klapp BF and Arck PC. Heme oxygenases in pregnancy II: HO-2 is downregulated in human pathologic pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 66-76.
- [90] Lash GE, McLaughlin BE, MacDonald-Goodfellow SK, Smith GN, Brien JF, Marks GS, Nakatsu K and Graham CH. Relationship between tissue damage and heme oxygenase expression in chorionic villi of term human placenta. *Am J Physiol Heart C Physiol* 2003; 284: H160-H167.
- [91] Poss KD and Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 98: 10919-10924.
- [92] Zhao H, Wong RJ, Kalish FS, Nayak NR and Stevenson DK. Effect of heme oxygenase-1 deficiency on placental development. *Placenta* 2009; 30: 861-868.
- [93] Song H, Lim H, Paria BC, Matsumoto H, Swift LL, Morrow J, Bonventre JV, Dey SK. Cytosolic phospholipase A 2 α is crucial for 'on-time' embryo implantation that directs subsequent development. *Development* 2002; 129: 2789-2889.
- [94] Linzke N, Schumacher A, Woidacki K, Croy BA, Zenclussen AC. Carbon monoxide promotes proliferation of uterine natural killer cells and remodeling of spiral arteries in pregnant hypertensive heme oxygenase-1 mutant mice. *Hypertension* 2014; 63: 580-588.
- [95] Solano ME, Kowal MK, O'Rourke GE, Horst AK, Modest K, Plösch T, Barikbin R, Remus CC, Berger RG, Jago C, Ho H, Sass G, Parker VJ, Lzdon JP, DeMayo FJ, Hecher K, Karimi K and Arck PC. Progesterone and HMOX-1 promote fetal growth by CD8 T cell modulation. *J Clin Invest* 2015; 125: 1726-1738.
- [96] Hatta K, Carter AL, Chen Z, Leno-Duran E, Ruiz-Ruiz C, Olivares EG, Tse MY, Pagn SC and Croy BA. Expression of the vasoactive proteins AT1, AT2, and ANP by pregnancy-induced mouse uterine natural killer cells. *Reprod Sci* 2011; 18: 383-390.
- [97] Zhao H, Azuma J, Kalish F, Wong RJ and Stevenson DK. Maternal heme oxygenase 1 regulates placental vasculature development via angiogenic factors in mice. *Biol Reprod* 2011; 85: 1005-1012.
- [98] Cudmore M, Ahmad S, Al-Ani B, Fujisawa T, Coxall H, Chudasama K, Devery LR, Wigmore SJ, Abbas A, Hewett PW and Ahmed A. Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1. *Circulation* 2007; 115: 1789-1797.
- [99] Sollwedel A, Bertoja AZ, Zenclussen ML, Gerlof K, Lisewski U, Wafula P, Sawityki B, Woiciechowsky C, Volk HD and Zenclussen AC. Protection from abortion by heme oxygenase-1 up-regulation is associated with increased levels of Bag-1 and Neuropilin-1 at the fetal-maternal interface. *J Immunol* 2005; 175: 4875-4885.
- [100] Schumacher A, Wafula PO, Teles A, El-Mousleh T, Linzke N, Zenclussen ML, Langwisch S, Heinze K, Wollenberg I, Casalis PA, Volk HD, Fest S and Zenclussen AC. Blockage of heme oxygenase-1 abrogates the protective effect of regulatory T cells on murine pregnancy and promotes the maturation of dendritic cells. *PLoS One* 2012; 7: e42301.
- [101] Zenclussen AC, Schumacher A, Zenclussen ML, Wafula P and Volk HD. Immunology of pregnancy: cellular mechanisms allowing fetal survival within the maternal uterus. *Expt Rev Mol Med* 2007; 9: 1-14.
- [102] Zenclussen ML, Anegon I, Bertoja AZ, Chauveau C, Vogt K, Gerlof K, Sollwedel A, Volk HD, Ritter T and Zenclussen AC. Over-expression of heme oxygenase-1 by adenoviral gene transfer improves pregnancy outcome in a murine model of abortion. *J Reprod Immunol* 2006; 69: 35-52.
- [103] Kreiser D, Nguyen X, Wong R, Seidman D, Stevenson D, Quan S, Abraham N and Dennerly PA. Heme oxygenase-1 modulates fetal growth in the rat. *Lab Invest* 2002; 82: 687-692.
- [104] Tachibana M, Hashino M, Nishida T, Shimizu T, Watarai M, Bereswill S. Protective role of heme oxygenase-1 in *Listeria monocytogenes*-induced abortion. *PLoS One* 2011; 6: e25046.
- [105] Tachibana M, Watanabe K, Yamasaki Y, Suzuki H and Watarai M. Expression of heme oxygenase-1 is associated with abortion caused by *Brucella abortus* infection in pregnant mice. *Microb Pathogenesis* 2008; 45: 105-109.

The antioxidative properties of S-allyl cysteine not only influence somatic cells but also improve early embryo cleavage in pigs

Markéta Dvořáková¹, Ivona Heroutová¹, David Němeček¹, Kateřina Adámková¹, Tereza Krejčová¹, Jan Nevorál^{1,2}, Veronika Kučerová Chrpová¹, Jaroslav Petr³ and Markéta Sedmíková¹

¹ Department of Veterinary Sciences, Czech University of Life Sciences, Prague, Czech Republic

² Biomedical center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Plzen, Czech Republic

³ Institute of Animal Science, Prague, Czech Republic

ABSTRACT

In vitro cultivation systems for oocytes and embryos are characterised by increased levels of reactive oxygen species (ROS), which can be balanced by the addition of suitable antioxidants. S-allyl cysteine (SAC) is a sulfur compound naturally occurring in garlic (*Allium sativum*), which is responsible for its high antioxidant properties. In this study, we demonstrated the capacity of SAC (0.1, 0.5 and 1.0 mM) to reduce levels of ROS in maturing oocytes significantly after 24 (reduced by 90.33, 82.87 and 91.62%, respectively) and 48 h (reduced by 86.35, 94.42 and 99.05%, respectively) cultivation, without leading to a disturbance of the standard course of meiotic maturation. Oocytes matured in the presence of SAC furthermore maintained reduced levels of ROS even 22 h after parthenogenic activation (reduced by 66.33, 61.64 and 57.80%, respectively). In these oocytes we also demonstrated a growth of early embryo cleavage rate (increased by 33.34, 35.00 and 35.00%, respectively). SAC may be a valuable supplement to cultivation media.

Subjects Biotechnology, Developmental Biology, Veterinary Medicine

Keywords Antioxidant, S-allyl cysteine, Garlic, Oocyte, Pigs

INTRODUCTION

During meiotic maturation in in vitro conditions, oocytes acquire developmental competence, which is decisive with regard to the capacity of the fertilised oocyte to develop into a viable embryo (*Wassarman, 1988*). Oxidative stress negatively influences meiotic maturation by influencing the properties of its cytoskeleton. It damages the microfilaments of the maturing oocyte (*Jiao et al., 2013*), disturbs the dynamics of the microtubular network and the attachment of chromosomes to microtubules (*Choi et al., 2007*). Oxidative stress negatively influences homeostasis of calcium ions (*Ambruosi et al., 2011*). It also impairs the redistribution of cortical granules during the course of meiotic maturation, which increases the incidence of polyspermy after in vitro fertilisation (IVF) (*Jiao et al., 2013*). Excessive production of reactive oxygen species

Submitted 8 May 2016

Accepted 2 July 2016

Published 4 August 2016

Corresponding author

Markéta Dvořáková,
dvorakova2@af.czu.cz

Academic editor

Xiang-Jiao Yang

Additional Information and
Declarations can be found on
page 9

DOI 10.7717/peerj.2280

© Copyright

2016 Dvořáková et al.

Distributed under

Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

(ROS) reduces the percentage of formed pronuclei in porcine oocytes following IVF ([Alvarez et al., 2015](#)).

Oxidative stress is a consequence of increased levels of ROS in cells. Balanced levels of ROS are important for the correct functioning of the organism, and are also important in the process of meiotic maturation. A proportionate amount of ROS in the follicular fluid supports germinal vesicle breakdown, by which the process of meiotic maturation begins ([Takami et al., 1999](#)). The follicular fluid also contains antioxidants. Balance of the levels of ROS and antioxidants in the follicular fluid is of key importance for the successful course of meiotic maturation ([Pasqualotto et al., 2004](#)).

In vitro cultivation systems used for the cultivation of oocytes are endangered by increased levels of ROS and the development of oxidative stress, because cultivation media contain a range of components manifesting pro-oxidative activity. These include, for example, energy sources such as lactate and pyruvate ([Hashimoto et al., 2000](#)), and hormones ([Markides, Roy & Liehr, 1998](#)). Transitory exposure of in vitro cultures to light ([Takenaka, Horiuchi & Yanagimachi, 2007](#)) and increased concentrations of oxygen ([Agarwal, Saleh & Bedaiwy, 2003](#)) also increases the production of ROS in cultivation systems.

Balancing increased levels of ROS in a cultivation medium by the addition of suitable antioxidants may prevent the development of oxidative stress and thus have a positive influence on early embryo cleavage of matured oocytes. Several sources of antioxidant substances are known, and more are being sought within the framework of ongoing studies. These, for example, include the amino acid cysteine, which reduces levels of ROS in maturing bovine oocytes ([Morado et al., 2009](#)). A cysteine derivative, N-acetyl cysteine (NAC), positively influences the formation of pronuclei and the development of blastocytes in vitro in pigs ([Whitaker, Casey & Taupier, 2012](#)).

Antioxidants also include a further cysteine derivative, the sulfur compound S-allyl cysteine (SAC), which is responsible for the high antioxidant activity of garlic ([Colín-González et al., 2015](#)). SAC is known for its anti-apoptotic and antioxidant effects in a range of types of somatic cells. SAC manifests antioxidant properties for example in the nervous ([Tsai et al., 2011](#)) and cardiovascular systems ([Louis et al., 2012](#)). [Takemura et al. \(2014\)](#) published a study demonstrating the antioxidant effects of SAC on rat sperm.

In somatic cells SAC manifests better antioxidant properties in comparison with cysteine. Upon oral administration to mice it brought about a larger increase in the activity of antioxidant enzymes in plasma, the kidneys and liver in comparison with cysteine ([Hsu et al., 2004](#)). In addition, according to [Dion, Agler & Milner \(1997\)](#), SAC is more effective than cysteine in the protection of liver cells against the mutagenic effects of nitrosomorpholine. To date no study has been published dealing with the potential antioxidant effects of SAC on maturing oocytes.

The aim of the presented study was to test the hypothesis that SAC influences meiotic maturation of porcine oocytes and early embryo cleavage during in vitro cultivation.

MATERIALS AND METHODS

Collection and cultivation of oocytes and evaluation of meiotic maturation

Oocytes were obtained from ovaries through aspiration from follicles (2–5 mM in diameter) with 20G needles and cultured in a modified M199 medium (Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with calcium L-lactate (2.75 mM; Sigma Aldrich, USA), sodium pyruvate (0.25 mg/mL; Sigma Aldrich, USA), gentamicin (0.025 mg/mL; Sigma Aldrich, USA), HEPES (6.3 mM; Sigma Aldrich, USA), 10% (v/v) foetal calf serum (Gibco BRL, Life Technologies, Germany), albumin (5 mg/mL; Sigma Aldrich, USA) and 13.5 IU eCG: 6.6 IU hCG/mL (P.G. 600, Intravet, Boxmeer, Netherlands). Oocytes were cultured with SAC (Sigma Aldrich, USA) in concentrations of 0.0 (control), 0.1, 0.5, 1.0 and 5.0 mM for 24 and 48 h (39 °C; 5% CO₂). The concentration of 5.0 mM was applied in experiments concerning nuclear maturation only.

After culture oocytes were denuded of cumulus cells by repeated pipetting through a narrow glass capillary and mounted on slides. The following stages of meiotic maturation were evaluated under a phase contrast microscope: germinal vesicle (GV), metaphase I (MI) and metaphase II (MII).

MPF/MAPK double assay

Kinase Double Assay was performed according to [Kubelka et al. \(2000\)](#). Briefly, samples were prepared from 15 oocytes cultivated with SAC by 5 µl extraction buffer addition and immediately frozen (–80 °C). Specific substrates H1 (Histone H1) and Myelin Basic Protein (MBP) were phosphorylated using radioactive labelled [γ -³²P]ATP, 500 µCi/mL (GE Healthcare Life Sciences, USA) and separated by SDS-PAGE. The signal intensities were measured by IP-plate, FLA 7000 reader (GE Healthcare Life Sciences, USA) and Multi-Gauge 2.0 software (Fujifilm, Japan). The obtained data was expressed relative to MPF/MAPK activities in oocytes in GV stage where we expect the lowest measured activities of MPF and MAPK.

Measurement of hyaluronic acid production within cumulus-oocyte complexes

Groups of 25 cumulus-oocyte complexes (COCs) were cultured for 24 and 48 h, washed four times in 500 µl PBS-PVA (0.01%) transferring them gently using a 50 µl pipette. Oocytes were denuded from cumulus cells and removed from samples. Samples were transferred into Eppendorf tubes, enzymatically digested using lyase from *Streptomyces hyalurolyticus* (20 µl/mL; Sigma-Aldrich, USA) at 39 °C overnight, centrifuged (5 min; 10,000 rpm, 4 °C) and measured in a Helios Epsilon spectrophotometer (Verkon, Czech Republic) at 216 nm.

Reactive oxygen species measurement

Reactive oxygen species production was evaluated in oocytes after 24 and 48 h of meiotic maturation and zygotes after 22 h of cultivation. Oocytes and zygotes were stained with 10 µM 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (Sigma-Aldrich, USA) (20 min; 39 °C) and mounted on glass. Samples were evaluated using a confocal microscope

(Leica SPE) and NIS Elements 4.0 software (Laboratory Imaging, Czech Republic). The results were expressed as the relative fluorescence intensity and related to the control group.

Parthenogenic activation of oocytes

Parthenogenic activation was carried out according to *Jílek et al. (2001)*. Briefly, matured oocytes denuded from cumulus cells were activated using calcium ionophore A23187 (25 μ M, 5 min; Sigma Aldrich, USA) and 6-dimethylaminopurine—6-DMAP (2 mM, 2 h; Sigma Aldrich, USA) and cultivated in a modified M199 medium without hormones for 22 h. Activating potential was evaluated as the ratio of zygotes with 1 or 2 pronuclei and cleaving embryos. Early embryo cleavage was evaluated as the ratio of cleaving embryos among activated oocytes.

Statistical analysis

Each experimental group contained 120 oocytes for nuclear maturation and parthenogenic activation assessment, 100 for hyaluronic acid production assessment and 60 for MPF/MAPK Double Assay and ROS measurement. All experiments were repeated four times. SAS 9.0 Software (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) was used for the statistical analyses. Significant differences between groups were determined using the one-way ANOVA test followed by Scheffe's method. $P < 0.05$ were considered significant. Statistically significant differences among different groups of oocytes are indicated by different superscripts.

Design of the experiments

Experiment 1 was performed in order to investigate the effect of SAC on the meiotic maturation of porcine oocytes. The oocytes were cultured for 24 and 48 h in vitro in the maturation medium described above, and supplemented with SAC in different concentrations. At the end of culture, stages of meiotic maturation, MPF and MAPK activity and hyaluronic acid production were evaluated.

Experiment 2 was focused on the effect of SAC on ROS levels in oocytes after 24 and 48 h of meiotic maturation and zygotes after subsequent 22 h of cultivation. We investigated the effect of SAC on ROS production as an indicator of oxidative stress and therefore quality of oocytes.

Experiment 3 was performed in order to evaluate the effect of SAC applied during meiotic maturation on subsequent parthenogenic activation. Activating potential and early embryo cleavage were considered as indicators of oocyte quality.

RESULTS

Effect of S-allyl cysteine on meiotic maturation of porcine oocytes

Nuclear maturation, cytoplasmic maturation and hyaluronic acid production were used as markers of successful meiotic maturation. Nuclear maturation was evaluated as a stage of meiotic maturation. SAC did not influence nuclear maturation despite the concentration of 5 mM which disrupts the standard course of the process (see [Fig. 1A](#)). This concentration was not applied in further experiments.

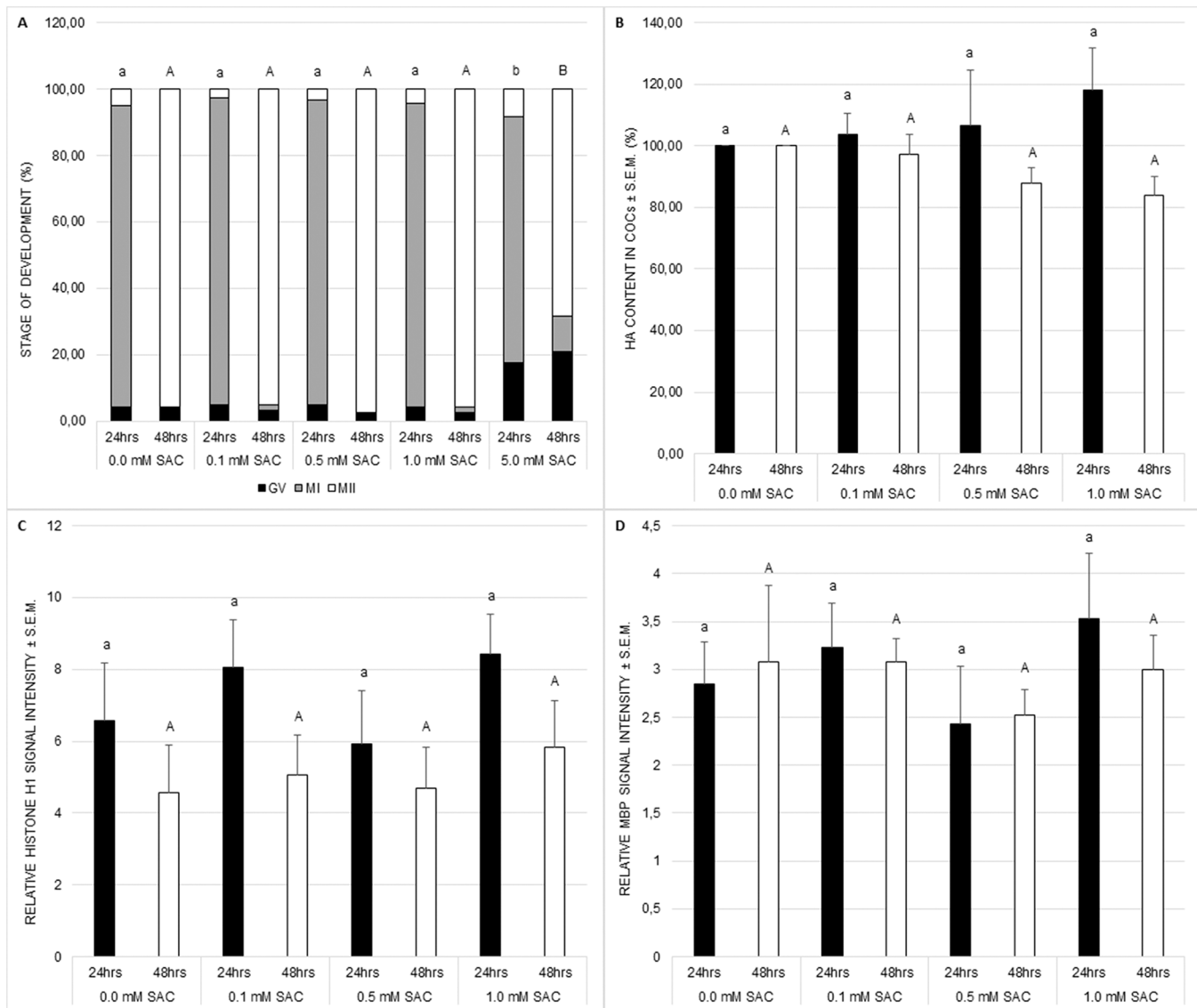


Figure 1 Effects of various SAC concentrations on porcine oocyte meiotic maturation after 24 and 48 h of cultivation. (A) Effects of SAC on nuclear maturation. GV—oocytes in the germinal vesicle stage, MI—oocytes in metaphase I, and MII—oocytes in metaphase II. Statistically significant differences between nuclear maturation stages (GV, MI, and MII) from various SAC concentrations are indicated by different superscripts: a, b—differences between nuclear maturation stages from various SAC concentrations after 24 h of cultivation ($P < 0.05$). A, B—differences between nuclear maturation stages from various SAC concentrations after 48 h of cultivation ($P < 0.05$). Data are presented as a mean of four replicates ($n = 120$ in each group). (B) Effects of SAC on hyaluronic acid (HA) content within COCs. Statistically significant differences between HA contents from various SAC concentrations are indicated by different superscripts: a, b—differences between HA contents from various SAC concentrations after 24 h of cultivation ($P < 0.05$). A, B—differences between HA contents from various SAC concentrations after 48 h of cultivation ($P < 0.05$). Data are presented as a mean \pm S.E.M. of four replicates ($n = 100$ in each group). (C) Effects of SAC on MPF activity. Phosphorylated histone H1 signal intensity is related to signal intensity in GV oocytes and reflects changes in MPF activity. Statistically significant differences between relative histone H1 signal intensities from various SAC concentrations are indicated by different superscripts: a, b—differences between relative histone H1 signal intensities from various SAC concentrations after 24 h of cultivation ($P < 0.05$). A, B—differences between relative histone H1 signal intensities from various SAC concentrations after 48 h of cultivation ($P < 0.05$). Data are presented as a mean \pm S.E.M. of four replicates ($n = 60$ in each group). (D) Effects of SAC on MAPK activity. Phosphorylated MBP signal intensity is related to signal intensity in GV oocytes and reflects changes in MAPK activity. Statistically significant differences between relative MBP signal intensities from various SAC concentrations are indicated by different superscripts: a, b—differences between relative MBP signal intensities from various SAC concentrations after 24 h of cultivation ($P < 0.05$). A, B—differences between relative MBP signal intensities from various SAC concentrations after 48 h of cultivation ($P < 0.05$). Data are presented as a mean \pm S.E.M. of four replicates ($n = 60$ in each group).

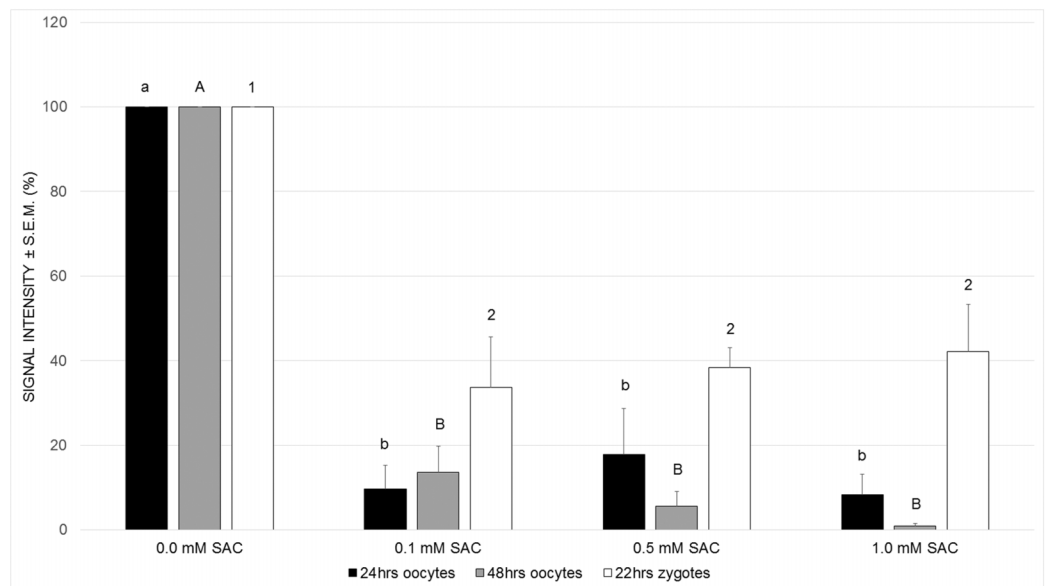


Figure 2 Effects of SAC on ROS production in porcine oocytes after 24 and 48 h of cultivation, and in zygotes after 22 h of cultivation. Statistically significant differences between ROS levels from various SAC concentrations are indicated by different superscripts: a, b—differences between ROS levels from various SAC concentrations after 24 h of cultivation ($P < 0.05$). A, B—differences between ROS levels from various SAC concentrations after 48 h of cultivation ($P < 0.05$). 1, 2—differences between ROS levels from various SAC concentrations after 22 h of cultivation of parthenogenetically activated oocytes ($P < 0.05$). Data are presented as a mean \pm S.E.M. of four replicates ($n = 60$ in each group).

Cytoplasmic maturation was evaluated as MPF and MAPK activities. MPF and MAPK activities as well as hyaluronic acid production by COCs were not influenced by SAC (see Figs. 1B–1D).

Effect of S-allyl cysteine on reactive oxygen species production in porcine oocytes and zygotes

In these experiments we measured levels of ROS in order to prove our hypothesis that SAC has antioxidant activity in oocytes, as has been proven in somatic cells.

Primarily, we cultivated maturing oocytes in the presence of SAC in concentrations 0.1, 0.5 and 1.0 mM and evaluated levels of ROS within oocytes after 24 and 48 h of cultivation. We observed a significant decrease in ROS production in all experimental groups after 24 as well as 48 h of cultivation (see Fig. 2).

Obtaining these results, we continued in experiments by parthenogenic activation of oocytes matured in the presence of SAC. We evaluated ROS levels in zygotes 22 h after parthenogenic activation. According to our results, parthenogenetically activated zygotes maintained their antioxidant capacity and exhibited lowered ROS levels when compared to the control group (see Fig. 2).

Effect of S-allyl cysteine on oocyte parthenogenic activation

In the following experiments we focused on the effect of SAC on activating potential and early embryonic cleavage as indicators of embryo quality. SAC in concentrations

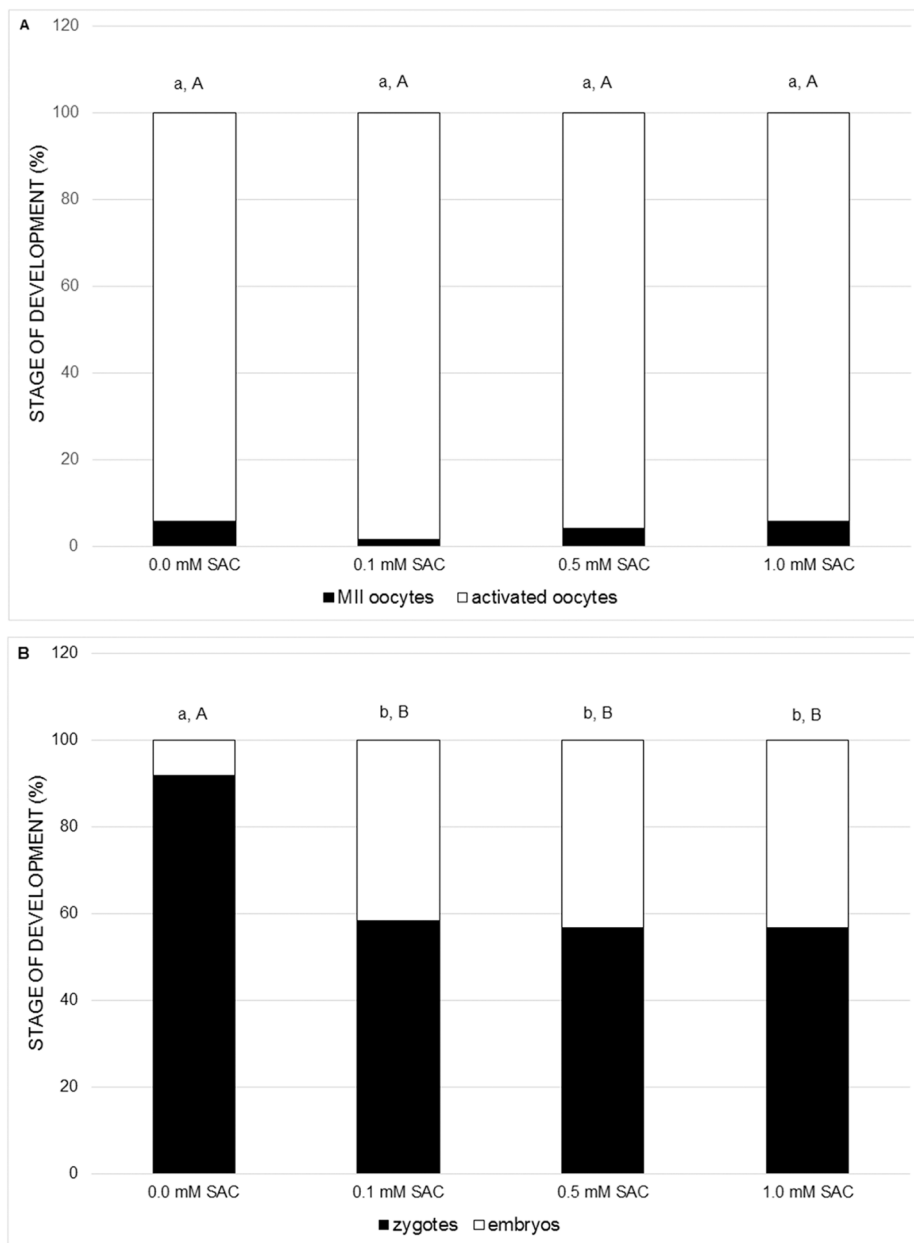


Figure 3 Effects of various SAC concentrations on parthenogenic activation of porcine oocytes.

(A) Effects of SAC on the activating potential of parthenogenetically activated oocytes after 22 h of cultivation. MII oocytes—oocytes in metaphase II, activated oocytes—zygotes with one or two pronuclei and 2–3-cell cleaving embryos. Statistically significant differences between oocyte developmental stages from various SAC concentrations are indicated by different superscripts: a, b—differences between percentages of MII oocytes from various SAC concentrations ($P < 0.05$). A, B—differences between percentages of activated oocytes from various SAC concentrations ($P < 0.05$). Data are presented as a mean of four replicates ($n = 120$ in each group). (B) Effects of SAC on the early embryo development of parthenogenetically activated oocytes after 22 h of cultivation. Zygotes had one or two pronuclei; embryos consisted of 2 or 3 cells. Statistically significant differences between oocyte developmental stages from various SAC concentrations are indicated by different superscripts: a, b—differences between percentages of zygotes from various SAC concentrations ($P < 0.05$). A, B—differences between percentages of embryos from various SAC concentrations ($P < 0.05$). Data are presented as a mean of four replicates ($n = 120$ in each group).

0.1, 0.5 and 1.0 mM did not affect activating potential, however it enhances early embryo cleavage in comparison to the control (see [Figs. 3A and 3B](#)).

DISCUSSION

In our study, we demonstrated that SAC reduces levels of ROS in porcine oocytes during their maturation in vitro. In the case of oocytes maturing in the presence of SAC we did not observe deviations during the course of nuclear maturation or in the activity of kinases of key importance for the meiotic maturation of oocytes. Expansion of cumulus was also not influenced by cultivation. After parthenogenic activation we observed a higher proportion of cleaving embryos in oocytes maturing in the presence of SAC. The capacity of SAC to reduce intracellular levels of ROS has been described in somatic cells ([Tsai et al., 2011](#)). To the best of our knowledge, our study is the first to describe this effect of SAC on in vitro maturing mammal oocytes.

The marked reduction of intracellular levels of ROS observed in our study in porcine oocytes maturing in vitro in a medium enriched with SAC can be explained by the fact that both cysteine and the allyl group have antioxidant properties ([Chung, 2006](#)). It is known that the addition of cysteine alone or its derivatives (e.g. NAC) to the cultivation medium is capable of achieving a suppression of intracellular levels of ROS upon cultivation of oocytes and embryos in vitro ([Alvarez et al., 2015](#); [Giorgi et al., 2015](#)). According to several in vivo experiments SAC has stronger antioxidant effects on various types of tissues than cysteine alone ([Hsu et al., 2004](#)) or than NAC ([Mizuguchi et al., 2006](#)).

In our study, the reduction of ROS levels did not have a significant impact on the observed aspects of maturation of porcine oocytes. This could indicate that porcine oocytes are relatively resistant to the effects of ROS. This is attested to also by the observations of [Alvarez et al. \(2015\)](#), in which the increase of ROS levels had no impact on maturation. However, [Alvarez et al. \(2015\)](#) describe an increase in the proportion of oocytes maturing to metaphase II after a reduction of ROS by the addition of cysteine to the cultivation medium for maturation.

In our experiments we did not demonstrate the influence of SAC added during meiotic maturation on the proportion of oocytes emerging from metaphase II following parthenogenic activation (thus the effect on the activation rate). However, in all applied concentrations (0.1, 0.5 and 1.0 mM), SAC increased the percentage of cleaving zygotes following parthenogenic activation. A similar effect has also been described in the case of cysteine which, in the study by [Li et al. \(2014\)](#), increased early embryo cleavage of porcine oocytes following ICSI, and also in the case of NAC, which improved the formation of male pronuclei and subsequent embryonic development ([Whitaker, Casey & Taupier, 2012](#)). On the basis of our results it is possible to conclude that SAC positively influences early embryo cleavage, a significant indicator of the quality of activated oocytes. This effect may be the result of suppression of ROS levels in zygotes, which persists from previous maturation of oocytes in the presence of SAC.

SAC need not act on oocytes cultivated in vitro only as an antioxidant reducing intracellular levels of ROS, but may also have an indirect effect via other target systems. SAC is also capable of increasing the activity of antioxidant enzymes such as catalase

and glutathione peroxidase (Hsu *et al.*, 2004), by increasing intracellular levels of glutathione, which is known as a significant antioxidant responsible for uptake of ROS in cells (Kohen & Nyska, 2002). Also significant may be the capacity of SAC to increase the intracellular concentration of hydrogen sulfide (Szabó, 2007), which ranks among significant gaseous signalling molecules termed gasotransmitters (Kamoun, 2004). Hydrogen sulfide plays a significant role in regulating the maturation of mammal oocytes (Nevoral *et al.*, 2014).

The extent to which hydrogen sulfide contributed to the effects of SAC we observed is not clear. In this study, in the case of COCs, after cultivation with SAC we did not observe an acceleration of maturation of oocytes or a suppression of expansion of cumulus cells, which is manifested under the influence of hydrogen sulfide on COCs (Nevoral *et al.*, 2014). On the other hand, sulfide ions may have a whole range of indirect effects on oocytes. Hydrogen sulfide influences the activity of several proteins, including enzymes and the ion channels of their sulfhydrylation (Paul & Snyder, 2012). Sulfide ions also have an effect on the activity of other gasotransmitters—nitric oxide and carbon monoxide (Li, Hsu & Moore, 2009), which may significantly influence the maturation of oocytes (Jablonka-Shariff & Olson, 1998).

CONCLUSIONS

Further experiments will be required for a more detailed clarification of the effect of SAC on oocytes and their developmental competence. Our experiments indicate that SAC is an antioxidant suitable as a supplement to cultivation media for oocytes because it does not disturb the course of meiotic maturation, which is sensitive to imbalance of ROS. The addition of SAC to *in vitro* cultivation systems may make a significant contribution to the success of *in vitro* maturation and subsequent activation and the early embryonic development of oocytes.

ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

Funding

This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (NAZV–Project No. QJ1510138; MZeRO 0714) and by Internal Grant Agency of the Czech University of Life Sciences Prague (CIGA) (Project No. CZU20142049). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:
Ministry of Agriculture of the Czech Republic: NAZV–QJ1510138; MZeRO 0714.
Czech University of Life Sciences Prague (CIGA): CZU20142049.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author Contributions

- Markéta Dvořáková conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, wrote the paper, prepared figures and/or tables.
- Ivona Heroutová performed the experiments.
- David Němeček performed the experiments.
- Kateřina Adámková performed the experiments.
- Tereza Krejčová performed the experiments.
- Jan Nevoral performed the experiments.
- Veronika Kučerová Chrpová performed the experiments.
- Jaroslav Petr conceived and designed the experiments, reviewed drafts of the paper.
- Markéta Sedmíková conceived and designed the experiments, reviewed drafts of the paper.

Data Deposition

The following information was supplied regarding data availability:

The raw data has been supplied as [Supplemental Dataset Files](#).

Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.2280#supplemental-information>.

REFERENCES

- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 79(4):829–843 DOI 10.1016/S0015-0282(02)04948-8.
- Alvarez GM, Morado SA, Soto MP, Dalvit GC, Cetica PD. 2015. The control of reactive oxygen species influences porcine oocyte *in vitro* maturation. *Reproduction in Domestic Animals* 50(2):200–205 DOI 10.1111/rda.12469.
- Ambruosi B, Filioli Uranio M, Sardanelli AM, Pocar P, Martino NA, Paternoster MS, Amati F, Dell'Aquila ME. 2011. In vitro acute exposure to DEHP affects oocyte meiotic maturation, energy and oxidative stress parameters in a large animal model. *PLoS ONE* 6(11):e27452 DOI 10.1371/journal.pone.0027452.
- Choi W-J, Banerjee J, Falcone T, Bena J, Agarwal A, Sharma RK. 2007. Oxidative stress and tumor necrosis factor- α -induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. *Fertility and Sterility* 88(4):1220–1231 DOI 10.1016/j.fertnstert.2007.02.067.
- Chung LY. 2006. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. *Journal of Medicinal Food* 9(2):205–213 DOI 10.1089/jmf.2006.9.205.
- Colín-González AL, Ali SF, Túnez I, Santamaría A. 2015. On the antioxidant, neuroprotective and anti-inflammatory properties of S-allyl cysteine: an update. *Neurochemistry International* 89:83–91 DOI 10.1016/j.neuint.2015.06.011.
- Dion ME, Agler M, Milner JA. 1997. S-allyl cysteine inhibits nitrosomorpholine formation and bioactivation. *Nutrition and Cancer* 28(1):1–6 DOI 10.1080/01635589709514545.
- Giorgi VSI, Da Broi MG, Paz CCP, Ferriani RA, Navarro PA. 2015. N-acetyl-cysteine and L-carnitine prevent meiotic oocyte damage induced by follicular fluid from infertile

women with mild endometriosis. *Reproductive Sciences* **23**(3):342–351
DOI [10.1177/1933719115602772](https://doi.org/10.1177/1933719115602772).

- 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**(4):520–526
DOI [10.1002/1098-2795\(200008\)56:4<520::AID-MRD10>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200008)56:4<520::AID-MRD10>3.0.CO;2-0).
- Hsu CC, Huang CN, Hung YC, Yin MC. 2004.** Five cysteine-containing compounds have antioxidative activity in Balb/cA mice. *Journal of Nutrition* **134**(1):149–152.
- Jablonka-Shariff A, Olson LM. 1998.** The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology* **139**(6):2944–2954 DOI [10.1210/endo.139.6.6054](https://doi.org/10.1210/endo.139.6.6054).
- 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. *PLoS ONE* **8**(3):e58018 DOI [10.1371/journal.pone.0058018](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058018).
- Jílek F, Hüttelová R, Petr J, Holubová M, Rozinek J. 2001.** Activation of pig oocytes using calcium ionophore: effect of the protein kinase inhibitor 6-dimethyl aminopurine. *Reproduction in Domestic Animals* **36**(3–4):139–145 DOI [10.1046/j.1439-0531.2001.00257.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00257.x).
- Kamoun P. 2004.** Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids* **26**(3):243–254 DOI [10.1007/s00726-004-0072-x](https://doi.org/10.1007/s00726-004-0072-x).
- 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 DOI [10.1080/01926230290166724](https://doi.org/10.1080/01926230290166724).
- Kubelka M, Motlík J, Schultz RM, Pavlok A. 2000.** Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes without influencing chromosome condensation activity. *Biology of Reproduction* **62**(2):292–302 DOI [10.1095/biolreprod62.2.292](https://doi.org/10.1095/biolreprod62.2.292).
- Li L, Hsu A, Moore PK. 2009.** Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation—a tale of three gases! *Pharmacology & Therapeutics* **123**(3):386–400 DOI [10.1016/j.pharmthera.2009.05.005](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.05.005).
- Li XX, Lee K-B, Lee JH, Kim KJ, Kim EY, Han K-W, Park K-S, Yu J, Kim MK. 2014.** Glutathione and cysteine enhance porcine preimplantation embryo development *in vitro* after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* **81**(2):309–314
DOI [10.1016/j.theriogenology.2013.09.030](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.030).
- Louis XL, Murphy R, Thandapilly SJ, 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**(1):140
DOI [10.1186/1472-6882-12-140](https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-140).
- Markides CSA, Roy D, Liehr JG. 1998.** Concentration dependence of prooxidant and antioxidant properties of catecholestrogens. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **360**(1):105–112
DOI [10.1006/abbi.1998.0934](https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0934).
- Mizuguchi S, Takemura S, Minamiyama Y, Kodai S, Tsukioka T, Inoue K, Okada S, Suehiro S. 2006.** S-allyl cysteine attenuated CCl₄-induced oxidative stress and pulmonary fibrosis in rats. *Biofactors* **26**(1):81–92 DOI [10.1002/biof.5520260108](https://doi.org/10.1002/biof.5520260108).
- Morado SA, Cetica PD, Beconi MT, Dalvit GC. 2009.** Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development* **21**(4):608–614 DOI [10.1071/RD08198](https://doi.org/10.1071/RD08198).
- Nevoral J, Petr J, Gelaude A, Bodart J-F, Kucerova-Chrpova V, Sedmikova M, Krejcova T, Kolbabova T, Dvorakova M, Vyskocilova A, Weingartova I, Krivohlavkova L,**

- Zalmanova T, Jilek F. 2014.** Dual effects of hydrogen sulfide donor on meiosis and cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. *PLoS ONE* **9(7)**:e99613 DOI [10.1371/journal.pone.0099613](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099613).
- Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ, Rose BI. 2004.** Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertility and Sterility* **81(4)**:973–976 DOI [10.1016/j.fertnstert.2003.11.021](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.11.021).
- Paul BD, Snyder SH. 2012.** H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13(8)**:499–507 DOI [10.1038/nrm3391](https://doi.org/10.1038/nrm3391).
- Szabó C. 2007.** Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery* **6(11)**:917–935 DOI [10.1038/nrd2425](https://doi.org/10.1038/nrd2425).
- Takami M, Preston SL, Toyloy VA, Behrman HR. 1999.** Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. *American Journal of Physiology* **276(4)**:E684–E688.
- Takemura S, Ichikawa H, Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T, Minamiyama Y. 2014.** S-allyl cysteine ameliorates the quality of sperm and provides protection from age-related sperm dysfunction and oxidative stress in rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **55(3)**:155–161 DOI [10.3164/jcfn.14-39](https://doi.org/10.3164/jcfn.14-39).
- 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(36)**:14289–14293 DOI [10.1073/pnas.0706687104](https://doi.org/10.1073/pnas.0706687104).
- Tsai SJ, Chiu CP, Yang HT, Yin MC. 2011.** s-Allyl cysteine, s-ethyl cysteine, and s-propyl cysteine alleviate β -amyloid, glycation, and oxidative injury in brain of mice treated by D-galactose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59(11)**:6319–6326 DOI [10.1021/jf201160a](https://doi.org/10.1021/jf201160a).
- Wassarman PM. 1988.** The mammalian ovum. In: Knobil E, Neil J, eds. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press.
- Whitaker BD, Casey SJ, Taupier R. 2012.** The effects of N-acetyl-L-cysteine supplementation on *in vitro* porcine oocyte maturation and subsequent fertilisation and embryonic development. *Reproduction, Fertility and Development* **24(8)**:1048–1054 DOI [10.1071/RD12002](https://doi.org/10.1071/RD12002).

GARLIC SULFUR COMPOUNDS SUPPRESS CANCEROGENESIS AND OXIDATIVE STRESS: A REVIEW*

M. Dvořáková, I. Weingartová, J. Nevoral, D. Němeček, T. Krejčová

University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Prague, Czech Republic

Garlic has long been considered a food with many health benefits. Several studies have confirmed that sulfur compounds are responsible for the positive effects of garlic on organisms. Garlic acts as an antioxidant by increasing antioxidant enzyme activity, reducing reactive oxygen species generation, and protecting proteins and lipids from oxidation. Garlic suppresses carcinogenesis through several mechanisms: (1) it reduces oxidative stress, and therefore, prevents damage to DNA; (2) it induces apoptosis or cell cycle arrest in cancer cells; and (3) it modifies gene expression through histone acetylation. The positive effects of garlic could be mediated by several mechanisms. It influences signalling pathways of gasotransmitters such as hydrogen sulfide. Garlic enhances hydrogen sulfide production both through its direct release and through an increase in activity of enzymes which produce hydrogen sulfide. Hydrogen sulfide acts as a signalling molecule in various tissues and participates in the regulation of many physiological processes. We can presume that garlic, which is able to release hydrogen sulfide, exhibits effects similar to those of this gasotransmitter.

cancer; diallyl disulfide; hydrogen sulfide; reactive oxygen species S-allyl cysteine



doi: 10.1515/sab-2015-0018

Received for publication on January 25, 2014

Accepted for publication on May 28, 2015

INTRODUCTION

The first statements about the beneficial health effects of garlic originate from 2600–2100 BC. Ancient medical books from Greece, Rome, Egypt, India, and China recommended garlic consumption as a way to improve health (G o r i n s t e i n et al., 2007).

Garlic stimulates the immune system; it has antibacterial, antiviral, antiparasitic (I c i e k et al., 2009), hepatoprotective (B a n e r j e e et al., 2003), and neuroprotective properties (B o r r e l l i et al., 2007), and decreases oxidative stress in cells. Garlic reduces the proliferation of some kinds of cancer cells (B a n e r j e e et al., 2003). It lowers blood cholesterol and triacylglycerol levels, reduces blood pressure, and prevents the development of atherosclerosis. It impairs thromboxane synthesis and therefore acts as an anticoagulant (I c i e k et al., 2009), and also decreases plasma glucose levels, which in turn prevents the development of diabetes mellitus (B a n e r j e e et al., 2003).

Biosynthesis and metabolism of biologically active compounds from garlic

Garlic contains several sulfur compounds, which are known for their positive physiological effects. Interestingly, the effects of garlic differ depending on whether crushed fresh garlic or aged garlic extract are applied.

Whole garlic bulbs contain gamma-glutamyl cysteine, which undergoes two important reactions: (1) through hydrolysis and oxidation it is converted into S-alkenyl sulfoxides, which include alliin (S-allyl cysteine sulfoxide); (2) through gamma-glutamyl transpeptidase activity it is converted into S-allyl cysteine (SAC). This second reaction occurs during the long-term extraction of the garlic bulb (C o r z o - M a r t i n e z et al., 2007).

Fresh garlic extract is formed when garlic bulbs are crushed. Alliin is converted into sulfonic acid, pyruvate, and ammonia during the process (A m a g a s e ,

* Supported by the Internal Grant Agency of the Czech University of Life Sciences Prague (CIGA) (Project No. 20142049).

2006). The reaction is conditioned by the presence of vacuolar enzyme alliinase. Whole alliin has been detected in the stomach, intestine, and liver of mice after its consumption without any further conversion (E g e n s c h w i n d et al., 1992; L a c h m a n n et al., 1994). The optimal pH level for alliinase activity is 6.5; levels under 3.6 are typical for the stomach environment, in which alliinase is ineffective. Alliinase activity is completely and irreversibly inhibited in stomach acid (L a w s o n , H u g h e s , 1992). Heat-processed garlic contains mainly alliin because alliinase is destroyed at temperatures of 60°C and higher.

Sulfonic acid, created from alliin through alliinase activity, is highly reactive and therefore it undergoes condensation, creating allicin (diallyl thiosulfinate) molecules (L a n z o t t i , 2006). Allicin is a volatile and highly unstable compound. It is instantly decomposed into oil-soluble diallyl monosulfide (DAS) and polysulfides, mainly diallyl disulfide (DADS) and diallyl trisulfide (DATS). Polysulfides are compounds likely to be responsible for the positive biological effects of garlic (F r e e m a n , K o d e r a , 1995).

Allicin is also converted into ajoene, a compound considered responsible for the anticoagulant effects of garlic (A p i t z c a s t r o et al., 1983; B l o c k et al., 1984).

Besides fresh garlic extract produced through the crushing of garlic bulbs, garlic could be processed through long-term extraction in 15–20% ethanol, which produces aged garlic extract (AGE). AGE contains less allicin in comparison with fresh garlic. Other compounds are generated during long-term extraction; gamma-glutamyl cysteine from intact garlic bulbs is converted into S-allyl cysteine (SAC) (A m a g a s e , 2006; C o l i n - G o n z a l e z et al., 2012). SAC has been detected in blood after AGE consumption in a dose-dependent manner (R o s e n et al., 2001; S t e i n e r , L i , 2001).

Sulfur compounds from AGE are stable and odorless; they have a milder, less specific flavour. They exhibit greater and more stable positive effects within the organism. They are safer in comparison with raw garlic (C o r z o - M a r t i n e z et al., 2007). Daily consumption of AGE at a dose of 1.8–10 g increases immune response in humans without any toxic side-effects (A m a g a s e , 2006)

The metabolism of garlic compounds has yet to be fully understood. Garlic sulfur compound levels in blood after garlic consumption are good markers of garlic metabolism.

Garlic protects cells from oxidative stress

Oxidative stress is caused by an imbalance between free radical generation and endogenous antioxidative activity (S t e a r e , Y e l l o n , 1995). DNA, protein and lipid oxidation through reactive oxygen species (ROS)

plays an important role in the ageing and development of many diseases. Endogenous antioxidants prevent cell damage through ROS. Reduced glutathione, superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase are among the most important endogenous antioxidants (B a n e r j e e et al., 2003).

Regular consumption of garlic significantly increases cell antioxidative activity (B a n e r j e e et al., 2002). Garlic prevents ROS generation and protects the mitochondrial membrane from oxidative stress, which alters membrane potential (C e r v a n t e s et al., 2013).

Alliin scavenges free radicals, protects lipids from oxidation, and increases antioxidative enzyme activity (B a n e r j e e et al., 2003).

Fresh garlic extract scavenges free radicals in a dose-dependent manner (P r a s a d et al., 1996), and therefore it protects brain and heart cells from oxidative stress-induced ischemia (B a t i r e l et al., 1996; B a n e r j e e et al., 2003). Fresh garlic reduces lipid peroxidation in the heart, liver, and kidneys (B a n e r j e e et al., 2001, 2002) and low-density lipoprotein (LDL) oxidation (L a u , 2001).

Allicin is the major compound of fresh garlic extract, however it is highly unstable. It reacts with cysteine and glutathione (R a b i n k o v et al., 2000), and creates substances which have antioxidative effects. Allicin and its derivatives can influence the activity of proteins through S-thiolation, which is one of many cell antioxidative mechanisms (P i n t o et al., 2006). Allicin binds LDL, and therefore prevents LDL oxidation in blood-vessel walls (G o n e n et al., 2005).

DAS and polysulfides increase the activity of antioxidative enzymes, and therefore protect cells from oxidative stress (F u k a o et al., 2004).

AGE exhibits the highest antioxidative activity. It prevents damage to DNA by free radicals and therefore protects cells from cancer development (B o r e k , 2001). AGE reduces the risk of cardiovascular and cerebrovascular diseases (L a u et al., 1987). It prevents damage to cell membranes and lipid peroxidation in pulmonary endothelial cells subjected to oxidized LDL. AGE reduces hydrogen peroxide and superoxide production. It increases the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in pulmonary endothelial cells (I d e et al., 1997).

The antioxidative effects of garlic can be mediated by nitric oxide (NO) production. SAC, the main compound of AGE, regulates NO production by two different pathways:

Oxidative stress triggers nuclear factor kappa (NFκB) activity, which is involved in the expression of proinflammatory enzymes such as inducible nitric oxide synthase, producing NO in cells. SAC inhibits NFκB activity, and therefore it exhibits an antiinflammatory effect (I d e , L a u , 2001).

However, SAC can enhance NO production in cell through the activation of calcium-dependent nitric

oxide synthase. NO inhibits hydrogen peroxide and superoxide production. SAC increases NO production in endothelial cells, and therefore enhances blood-vessel elasticity and protects them from inflammation and development of atherosclerosis (Das et al., 1995; Sooranna et al., 1995).

Garlic inhibits carcinogenesis

Garlic inhibits the growth of some tumors and cell proliferation. DAS and DATS suppress benzo(a)pyren-induced development of stomach cancer in mice (Sparnins et al., 1988). DADS prevents intestine and kidney cancer in carcinogen-treated mice (Takahashi et al., 1992). Other studies confirm that garlic monosulfides and polysulfides are effective against *in vitro*-induced carcinogenesis (Wargovich et al., 1988; Schaffer et al., 1996; Suzui et al., 1997). Consumption of AGE at a dose of 2.4 ml daily for 12 months reduces the size and number of colorectal adenomas in humans (Tanaka et al., 2006). Garlic has an antiproliferative effect on human cancer cells in transgenic animal models (Singh et al., 1996; Sundaram, Milner, 1996; Xiao et al., 2006a).

Considering the toxic effects of garlic sulfur compounds on cancer cells, it is necessary to investigate their potential toxic effects on normal cells. Certain studies demonstrate a higher tolerance of normal cells against the cytotoxic effects of garlic (Karmakar et al., 2007; Kim et al., 2007). However, other studies show toxic effects of garlic compounds on normal cells, especially those of the gastrointestinal tract (Joseph et al., 1989; Banerjee et al., 2003).

The anticarcinogenic effects of garlic compounds can be mediated by several mechanisms. Garlic induces an immune response in the organism (Lamm, Riggs, 2001). Garlic compounds prevent oxidative cell damage, and inhibit cell proliferation by induction of apoptosis or cell cycle arrest (Percelle et al., 1990). They enhance the activity of detoxification enzymes, which improve excretion of carcinogens (Guyonnet et al., 1999), and suppress the activity of P450 enzymes, which mediate the activation of procarcinogens (Dion, Milner, 1997). Garlic has anticlastogenic effects and it contributes to repairing damaged DNA (Khanum et al., 2004). It influences gene expression through post-translational modifications, and therefore alters the activity of cell cycle regulating proteins (Druesne-Pecollo et al., 2007). It also suppresses blood supply to tumors. AGE prevents proliferation of endothelial cells and enhances their adhesion to collagen and fibronectin, which in turn reduces their mobility. AGE inhibits blood supply to human colorectal carcinoma through this mechanism (Matsura et al., 2006). Alliin and DATS suppress angiogenesis by reducing vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion (Mousa, Mousa, 2005).

Garlic induces apoptosis in cancer cells

Garlic polysulfides induce oxidative stress in cancer cells through increased production of ROS. Enhanced oxidative stress triggers apoptotic signalling pathway. Cancer cells are especially sensitive to garlic compounds, since they possess a small amount of molecules with antioxidative properties (Filomeni et al., 2003; Xiao et al., 2004).

DADS enhances ROS generation and therefore activates the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway, which triggers cell death in neuroblastoma cells (Filomeni et al., 2003). DADS increases the expression of proapoptotic factors and reduces the expression of antiapoptotic factors in breast cancer cells (Nakagawa et al., 2001). It enhances intracellular levels of calcium ions, which in turn increases hydrogen peroxide production and activates caspases in human leukemic cells (Park et al., 2002).

DATS is more effective in the induction of apoptosis in human prostate cancer cells in comparison with DAS and DADS (Xiao et al., 2004). It degrades ferritin and therefore enhances cellular labile iron, which is in turn followed by ROS generation (Antosiewicz et al., 2006). It hyperphosphorylates and inactivates antiapoptotic factors through JNK and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) signalling pathways (Xiao et al., 2004). It causes conformational changes of proapoptotic factors, which lead to their transfer into mitochondria (Kim et al., 2007).

Ajoene activates NF κ B, stimulates ROS generation, induces apoptosis and cell cycle arrest in the G2 phase (Xu et al., 2004), and decreases intracellular levels of antiapoptotic factors (Li et al., 2002).

Garlic induces cell cycle arrest in cancer cells

A large amount of studies have confirmed the ability of garlic to induce cell cycle arrest, which could be a mechanism of cancerogenesis inhibition.

Garlic polysulfides inhibit cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) and enhance cyclin B1 expression in colon cancer cells (Knowles, Milner, 2000). They reduce Cdk-activating kinase activity in liver cancer cells (Wu et al., 2004) and Cdc25 activity in prostate cancer cells (Arunkumar et al., 2006). They activate mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38, which reduces Cdc25 phosphatase activity in stomach cancer cells (Yuan et al., 2004). DATS is more effective in the induction of cell cycle arrest in the liver (Wu et al., 2004) and prostate cancer cells in comparison with DAS and DADS. Normal epithelial prostate cells are more resistant to the toxic effect of DADS than cancer cells (Xiao et al., 2005).

Garlic polysulfides can induce cell cycle arrest in the S phase, G2 phase or prometaphase. Cell cycle arrest in G2 is caused by a reduction in the cdc25 activity (Xiao et al., 2005). Cell cycle arrest in the

prometaphase is connected with hypermethylation of key subunits of the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) (Herman-Antosiewicz et al., 2007).

Garlic induces microtubule depolymerization and changes in cytoskeleton in interphase cancer cells and disrupts mitotic spindle formation in mitosis (Hosono et al., 2005; Zhang et al., 2006). Garlic polysulfides initiate changes in the microtubule network, chromatin condensation, and phosphorylation of histone H3 in the M phase (Herman-Antosiewicz, Singh, 2005). DATS induces oxidative changes in beta-tubulin cysteine residues *in vitro* (Hosono et al., 2005).

Garlic regulates gene expression through histone acetylation

Garlic compounds mediate histone acetylation through an increase of histone acetylase activity and a reduction of histone deacetylase activity, and can therefore alter gene expression. Histone modification influences the expression of proteins in cancer cells and expression of proteins involved in cell cycle regulation.

DADS induces histone acetylation in human breast cancer cells and rat liver cancer cells through a reduction of histone deacetylase activity (Lea et al., 1999), and affects the activity of cell cycle regulating proteins, such as p21 kinase, MAPK3, inhibitors of DNA-binding proteins, and proteins involved in DNA repair through histone modification (Druesne-Pecollo et al., 2007). DADS enhances histone H3 and H4 acetylation in human leukemic cells and inhibits histone deacetylases in liver and breast cancer cells (Lea et al., 1999). Allicin and SAC enhance histone acetylation in breast and intestine cancer cells (Lea et al., 2002).

Garlic influences cell signalization through hydrogen sulfide production

Hydrogen sulfide is well known as a toxic gas. In recent times, its physiological function as a gaseous signalling molecule, a gasotransmitter within the organism, has been discovered (Wang, 2002). Hydrogen sulfide is a signalling molecule in the nervous (Abe, Kimura, 1996), cardiovascular (Zhao et al., 2001) and reproductive systems (Srilatha et al., 2007). Cystathionine-gamma-lyase (CSE) and cystathionine-beta-synthase (CBS) are enzymes synthesizing hydrogen sulfide within the organism (Wang, 2002).

Positive garlic effects can be mediated through hydrogen sulfide production. Human red blood cells produce hydrogen sulfide in anoxic conditions from garlic extract, allicin, DADS, and DATS in the presence of glutathione. The highest amount of hydrogen sulfide is generated from DATS. Addition of DADS into blood enhances amounts of exhaled hydrogen sulfide in rats (Insko et al., 2009). DADS and DATS

vasodilate blood-vessels through hydrogen sulfide production (Benavides et al., 2007).

Hydrogen sulfide can be generated from cysteine derivatives through the activity of cystathionine gamma-lyase (CSE) (Wang et al., 2010). One of these cysteine derivatives, SAC, can act as a direct substrate for hydrogen sulfide production, as well as a compound regulating CSE activity. SAC enhances CSE activity, and therefore protects heart cells against infarction (Chuah et al., 2007). S-propargyl cysteine (SPRC), a structural analog of SAC, enhances CSE expression. Created hydrogen sulfide enhances p53 and Bax expression. SPRC reduces the viability and division of cancer cells through this mechanism (Ma et al., 2011).

CONCLUSION

Sulfur compounds from garlic have a significant positive effect on organisms. The method of processing is a key factor determining the biological activity of garlic. Garlic could be administered as a fresh or aged garlic extract (AGE). Fresh garlic extract possesses both prooxidative and antioxidative properties, which depends on a type of treated tissue. Cancer represents one of the most investigated diseases in the developed world. Cancer cells exhibit high sensitivity to oxidative stress-induced apoptosis mediated by garlic compounds when compared to healthy cells. Many currently widespread diseases, such as cardiovascular diseases, are caused by high content of reactive oxygen species in the environment which could be balanced by garlic compounds, especially those contained in aged garlic extract. Hydrogen sulfide is a gaseous molecule exhibiting antioxidative activity. It stabilizes mitochondrial membranes, and therefore protects cells against apoptosis. Garlic sulfur compounds are able to release hydrogen sulfide, which could represent their mechanism of action. This presumption should be approved more thoroughly using different types of tissues for wider implication of garlic health benefits.

REFERENCES

- Abe K, Kimura H (1996): The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of Neuroscience*, 16, 1066-1071.
- Amagase H (2006): Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *Journal of Nutrition*, 136, 716-725.
- Antosiewicz J, Herman-Antosiewicz A, Marynowski SW, Singh SV (2006): c-Jun NH2-terminal kinase signaling axis regulates diallyl trisulfide-induced generation of reactive oxygen species and cell cycle arrest in human prostate cancer cells. *Cancer Research*, 66, 5379-5386. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0356.

- Apitzcastro R, Cabrera S, Cruz MR, Ledezma E, Jain MK (1983): Effects of garlic extract and of 3 pure components isolated from it on human-platelet aggregation, arachidonate metabolism, release reaction and platelet ultrastructure. *Thrombosis Research*, 32, 155–169. doi: 10.1016/0049-3848(83)90027-0.
- Arunkumar A, Vijayababu MR, Srinivasan N, Aruldas MM, Arunakaran J (2006): Garlic compound, diallyl disulfide induces cell cycle arrest in prostate cancer cell line PC-3. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 288, 107–113. doi: 10.1007/s11010-006-9126-6.
- Banerjee SK, Maulik M, Manchanda SC, Dinda AK, Das TK, Maulik SK (2001): Garlic-induced alteration in rat liver and kidney morphology and associated changes in endogenous antioxidant status. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 793–797. doi: 10.1016/S0278-6915(01)00018-7.
- Banerjee SK, Maulik M, Mancahanda SC, Dinda AK, Gupta SK, Maulik SK (2002): Dose-dependent induction of endogenous antioxidants in rat heart by chronic administration of garlic. *Life Sciences*, 70, 1509–1518. doi: 10.1016/S0024-3205(01)01514-4.
- Banerjee SK, Mukherjee PK, Maulik SK (2003): Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly. *Phytotherapy Research*, 17, 97–106. doi: 10.1002/ptr.1281.
- Batirel HF, Aktan S, Aykut C, Yegen BC, Coskun T (1996): The effect of aqueous garlic extract on the levels of arachidonic acid metabolites (leukotriene C-4 and prostaglandin E(2)) in rat forebrain after ischemia-reperfusion injury. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 54, 289–292. doi: 10.1016/S0952-3278(96)90061-7.
- Benavides GA, Squadrito GL, Mills RW, Patel HD, Isbell TS, Patel RP, Darley-USmar VM, Doeller JE, Kraus DW (2007): Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 17977–17982. doi: 10.1073/pnas.0705710104.
- Block E, Ahmad S, Jain MK, Crecely RW, Apitzcastro R, Cruz MR (1984): (E,Z)-ajoene – a potent antithrombotic agent from garlic. *Journal of the American Chemical Society*, 106, 8295–8296. doi: 10.1021/ja00338a049.
- Borek C (2001): Antioxidant health effects of aged garlic extract. *Journal of Nutrition*, 131, 1010–1015.
- Borrelli F, Capasso R, Izzo AA (2007): Garlic (*Allium sativum* L.): adverse effects and drug interactions in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 1386–1397. doi: 10.1002/mnfr.200700072.
- Cervantes MI, Balderas PMD, Gutierrez-Banos JD, Orozco-Ibarra M, Fernandez-Rojas B, Medina-Campos ON, Espinoza-Rojo M, Ruiz-Tachiquin M, Ortiz-Plata A, Salazar MI, Rubio-Osornio M, Castaneda-Saucedo E, Pedraza-Chaverri J, Calzada F, Aguilera P (2013): Comparison of antioxidant activity of hydroethanolic fresh and aged garlic extracts and their effects on cerebral ischemia. *Food Chemistry*, 140, 343–352. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.02.053.
- Chuah SC, Moore PK, Zhu YZ (2007): S-allylcysteine mediates cardioprotection in an acute myocardial infarction rat model via a hydrogen sulfide-mediated pathway. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, 293, 2693–2701. doi: 10.1152/ajpheart.00853.2007.
- Colin-Gonzalez AL, Santana RA, Silva-Islas CA, Chanez-Cardenas ME, Santamaria A, Maldonado PD (2012): The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract- and S-allylcysteine-induced protection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, ID 907162. doi: 10.1155/2012/907162.
- Corzo-Martinez M, Corzo N, Villamiel M (2007): Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 609–625.
- Das I, Khan NS, Sooranna SR (1995): Nitric-oxide synthase activation is a unique mechanism of garlic action. *Biochemical Society Transactions*, 23, 136–136.
- Dion ME, Milner JA (1997): Garlic inhibits cytochrome P450 2E1 mediated chlorzoxazone metabolism. *Faseb Journal*, 11, 2144–2144.
- Druesne-Pecollo N, Chaumontet C, Pagniez A, Vaugelade P, Bruneau A, Thomas M, Cherbuy C, Duee PH, Martel P (2007): *In vivo* treatment by diallyl disulfide increases histone acetylation in rat colonocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354, 140–147. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.158.
- Egenschwind C, Eckard R, Kemper FH (1992): Metabolism of garlic constituents in the isolated perfused-rat-liver. *Planta Medica*, 58, 301–305.
- Filomeni G, Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR (2003): Reactive oxygen species-dependent c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide. *Cancer Research*, 63, 5940–5949.
- Freeman F, Koder Y (1995): Garlic chemistry – stability of S-(2-propenyl) 2-propene-1-sulfinothiolate (allicin) in blood, solvents, and simulated physiological fluids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2332–2338. doi: 10.1021/jf00057a004.
- Fukao T, Hosono T, Misawa S, Seki T, Ariga T (2004): The effects of allyl sulfides on the induction of phase II detoxification enzymes and liver injury by carbon tetrachloride. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 743–749. doi: 10.1016/j.fct.2003.12.010.
- Gonen A, Harats D, Rabinkov A, Miron T, Mirelman D, Wilchek M, Weiner L, Ulman E, Levkovitz H, Ben-Shushan D, Shaish A (2005): The antiatherogenic effect of allicin: possible mode of action. *Pathobiology*, 72, 325–334. doi: 10.1159/000091330.
- Gorinstein S, Jastrzebski Z, Namiesnik J, Leontowicz H, Leontowicz M, Trakhtenberg S (2007): The atherosclerotic heart disease and protecting properties of garlic: contemporary data. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 1365–1381. doi: 10.1002/mnfr.200700064.
- Guyonnet D, Siess MH, Le Bon AM, Suschetet M (1999): Modulation of phase II enzymes by organosulfur compounds

- from allium vegetables in rat tissues. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 154, 50–58. doi: 10.1006/taap.1998.8574.
- Herman-Antosiewicz A, Singh SV (2005): Checkpoint kinase 1 regulates diallyl trisulfide-induced mitotic arrest in human prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 28519–28528. doi: 10.1074/jbc.M501443200.
- Herman-Antosiewicz A, Stan SD, Hahm ER, Xiao D, Singh SV (2007): Activation of a novel ataxia-telangiectasia mutated and Rad3 related/checkpoint kinase 1-dependent pro-metaphase checkpoint in cancer cells by diallyl trisulfide, a promising cancer chemopreventive constituent of processed garlic. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6, 1249–1261. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0477.
- Hosono T, Fukao T, Ogihara J, Ito Y, Shiba H, Seki T, Ari-ga T (2005): Diallyl trisulfide suppresses the proliferation and induces apoptosis of human colon cancer cells through oxidative modification of beta-tubulin. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 41487–41493. doi: 10.1074/jbc.M507127200.
- Iciek M, Kwiecien I, Wlodek L (2009): Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50, 247–265. doi: 10.1002/em.20474.
- Ide N, Lau BHS (2001): Garlic compounds minimize intracel-lular oxidative stress and inhibit nuclear factor-kappa B activation. *Journal of Nutrition*, 131, 1020–1026.
- Ide N, Nelson AB, Lau BHS (1997): Aged garlic extract and its constituents inhibit Cu²⁺-induced oxidative modification of low density lipoprotein. *Planta Medica*, 63, 263–264. doi: 10.1055/s-2006-957668.
- Insko MA, Deckwerth TL, Hill P, Toombs CF, Szabo C (2009): Detection of exhaled hydrogen sulphide gas in rats ex-posed to intravenous sodium sulphide. *British Journal of Pharmacology*, 157, 944–951. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00248.x.
- Joseph PK, Rao KR, Sundaresh CS (1989): Toxic effects of garlic extract and garlic oil in rats. *Indian Journal of Ex-perimental Biology*, 27, 977–979.
- Karmakar S, Banik NL, Patel SJ, Ray SK (2007): Garlic com-pounds induced calpain and intrinsic caspase cascade for apoptosis in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Apoptosis*, 12, 671–684. doi: 10.1007/s10495-006-0024-x.
- Khanum F, Anilakumar KR, Viswanathan KR (2004): Anti-carcinogenic properties of garlic: a review. *Critical Re-views in Food Science and Nutrition*, 44, 479–488. doi: 10.1080/10408690490886700.
- Kim YA, Xiao D, Xiao H, Powolny AA, Lew KL, Reilly ML, Zeng Y, Wang Z, Singh SV (2007): Mitochondria-mediated apoptosis by diallyl trisulfide in human prostate cancer cells is associated with generation of reactive oxygen species and regulated by Bax/Bak. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6, 1599–1609. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0754.
- Knowles LM, Milner JA (2000): Diallyl disulfide inhibits p34(cdc2) kinase activity through changes in complex forma-tion and phosphorylation. *Carcinogenesis*, 21, 1129–1134. doi: 10.1093/carcin/21.6.1129.
- Lachmann G, Lorenz D, Radeck W, Steiper M (1994): Studies on the pharmacokinetics of the S-35 labeled garlic constituents alliin, allicin, and vinyldithiines. *Arzneimittelforschung*, 44, 734–743.
- Lamm DL, Riggs DR (2001): Enhanced immunocompetence by garlic: role in bladder cancer and other malignancies. *Journal of Nutrition*, 131, 1067–1070.
- Lanzotti V (2006): The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*, 1112, 3–22. doi: 10.1016/j.chro-ma.2005.12.016.
- Lau BHS (2001): Suppression of LDL oxidation by garlic. *Journal of Nutrition*, 131, 985–988.
- Lau BHS, Lam F, Wangcheng R (1987): Effect of an odor-modified garlic preparation on blood lipids. *Nutrition Re-search*, 7, 139–149. doi: 10.1016/S0271-5317(87)80026-X.
- Lawson LD, Hughes BG (1992): Characterization of the forma-tion of allicin and other thiosulfates from garlic. *Planta Medica*, 58, 345–350. doi: 10.1055/s-2006-961482.
- Lea MA, Randolph VM, Patel M (1999): Increased acetylation of histones induced by diallyl disulfide and structurally related molecules. *International Journal of Oncology*, 15, 347–352.
- Lea MA, Rasheed M, Randolph VM, Khan F, Shareef A, desBordes C (2002): Induction of histone acetylation and inhibition of growth of mouse erythroleukemia cells by S-allylmercaptocysteine. *Nutrition and Cancer – an International Journal*, 43, 90–102. doi: 10.1207/S15327914NC431_11.
- Li M, Min JM, Cui JR, Zhang LH, Wang K, Valette A, Davrinche C, Wright M, Leung-Tack J (2002): Z-ajoene induces apopto-sis of HL-60 cells: involvement of Bcl-2 cleavage. *Nutrition and Cancer – an International Journal*, 42, 241–247. doi: 10.1207/S15327914NC422_14.
- Ma KU, Liu Y, Zhu Q, Liu CH, Duan JL, Tan BKH, Zhu YZ (2011): H2S donor, S-propargyl-cysteine, increases CSE in SGC-7901 and cancer-induced mice: evidence for a novel anti-cancer effect of endogenous H2S? *PLOS ONE*, 6:e20525. doi: 10.1371/journal.pone.0020525.
- Matsuura N, Miyamae Y, Yamane K, Nagao Y, Hamada Y, Kawa-guchi N, Katsuki T, Hirata K, Sumi SI, Ishikawa H (2006): Aged garlic extract inhibits angiogenesis and proliferation of colorectal carcinoma cells. *Journal of Nutrition*, 136, 842–846.
- Mousa AS, Mousa SA (2005): Anti-angiogenesis efficacy of the garlic ingredient alliin and antioxidants: role of nitric oxide and p53. *Nutrition and Cancer – an International Journal*, 53, 104–110. doi: 10.1207/s15327914nc5301_12.
- Nakagawa H, Tsuta K, Kiuchi K, Senzaki H, Tanaka K, Hioki K, Tsubura A (2001): Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 22, 891–897.
- Park EK, Kwon KB, Park KI, Park BH, Jhee EC (2002): Role of Ca²⁺ in diallyl disulfide-induced apoptotic cell death of HCT-15 cells. *Experimental and Molecular Medicine*, 34, 250–257. doi: 10.1038/emm.2002.35.

- Perchellet JP, Perchellet EM, Belman S (1990): Inhibition of DMBA-induced mouse skin tumorigenesis by garlic oil and inhibition of 2 tumor-promotion stages by garlic and onion oils. *Nutrition and Cancer – an International Journal*, 14, 183–193. doi: 10.1080/01635589009514093.
- Pinto JT, Krasnikov BF, Coopert AJL (2006): Redox-sensitive proteins are potential targets of garlic-derived mercaptocysteine derivatives. *Journal of Nutrition*, 136, 835–841.
- Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Raney BL (1996): Evaluation of hydroxyl radical-scavenging property of garlic. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 154, 55–63. doi: 10.1007/BF00248461.
- Rabinkov A, Miron T, Mirelman D, Wilchek M, Glozman S, Yavin E, Weiner L (2000): S-allylmercaptogluthathione: the reaction product of allicin with glutathione possesses SH-modifying and antioxidant properties. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, 1499, 144–153. doi: 10.1016/S0167-4889(00)00119-1.
- Rosen RT, Hiserodt RD, Fukuda EK, Ruiz RJ, Zhou ZY, Lech J, Rosen SL, Hartman TG (2001): Determination of allicin, S-allylcysteine and volatile metabolites of garlic in breath, plasma or simulated gastric fluids. *Journal of Nutrition*, 131, 968–971.
- Schaffer EM, Liu JZ, Green J, Dangler CA, Milner JA (1996): Garlic and associated allyl sulfur components inhibit N-methyl-N-nitrosourea induced rat mammary carcinogenesis. *Cancer Letters*, 102, 199–204. doi: 10.1016/0304-3835(96)04160-2.
- Singh SV, Mohan R, Agarwal R, Benson PJ, Hu X, Rudy MA, Xia H, Katoh A, Srivastava SK, Mukhtar H, Gupta V, Zaren HA (1996): Novel anti-carcinogenic activity of an organosulfide from garlic: inhibition of H-RAS oncogene transformed tumor growth *in vivo* by diallyl disulfide is associated with inhibition of p21(H-ras) processing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 225, 660–665. doi: 10.1006/bbrc.1996.1226.
- Sooranna SR, Hirani J, Das I (1995): Garlic can induce both GTP cyclohydrolase and nitric oxide synthase activity in choriocarcinoma cells. *Biochemical Society Transactions*, 23, 543.
- Sparnins VL, Barany G, Wattenberg LW (1988): Effects of organosulfur compounds of garlic and onions on benzo(a)pyrene-induced neoplasia and glutathione S-transferase activity in the mouse. *Carcinogenesis*, 9, 131–134. doi: 10.1093/carcin/9.1.131.
- Srilatha B, Adayan PG, Li L, Moore PK (2007): Hydrogen sulfide: a novel gasotransmitter facilitates erectile function. *The Journal of Sexual Medicine*, 4, 1304–1311.
- Stearse SE, Yellon DM (1995): The potential for endogenous myocardial antioxidants to protect the myocardium against ischemia-reperfusion injury –refreshing the parts exogenous antioxidants cannot reach. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 27, 65–74. doi: 10.1016/S0022-2828(08)80008-9.
- Steiner M, Li W (2001): Aged garlic extract, a modulator of cardiovascular risk factors: a dose-finding study on the effects of AGE on platelet functions. *Journal of Nutrition*, 131, 980–984.
- Sundaram SG, Milner JA (1996): Diallyl disulfide suppresses the growth of human colon tumor cell xenografts in athymic nude mice. *Journal of Nutrition*, 126, 1355–1361.
- Suzui N, Sugie S, Rahman KMW, Ohnishi M, Yoshimi N, Wakabayashi K, Mori H (1997): Inhibitory effects of diallyl disulfide or aspirin on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo 4,5-b pyridine-induced mammary carcinogenesis in rats. *Japanese Journal of Cancer Research*, 88, 705–711.
- Takahashi S, Hakoi K, Yada H, Hirose M, Ito N, Fukushima S (1992): Enhancing effects of diallyl sulfide on hepatocarcinogenesis and inhibitory actions of the related diallyl disulfide on colon and rectal carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, 13, 1513–1518. doi: 10.1093/carcin/13.9.1513.
- Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Kajiyama G, Kira K, Amagase H, Chayama K (2006): Aged garlic extract has potential suppressive effect on colorectal adenomas in humans. *Journal of Nutrition*, 136, 821–826.
- Wang R (2002): Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB Journal*, 16, 1792–1798. doi: 10.1096/fj.02-0211hyp.
- Wang Q, Wang XL, Liu HR, Rose P, Zhu YZ (2010): Protective effects of cysteine analogues on acute myocardial ischemia: novel modulators of endogenous H₂S production. *Antioxidants and Redox Signaling*, 12, 1155–1165. doi: 10.1089/ars.2009.2947.
- Wargovich MJ, Woods C, Eng VWS, Stephens LC, Gray K (1988): Chemoprevention of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats by the naturally-occurring thioether, diallyl sulfide. *Cancer Research*, 48, 6872–6875.
- Wu CC, Chung JG, Tsai SJ, Yang JH, Sheen LY (2004): Differential effects of allyl sulfides from garlic essential oil on cell cycle regulation in human liver tumor cells. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1937–1947. doi: 10.1016/j.fct.2004.07.008.
- Xiao D, Choi S, Johnson DE, Vogel VG, Johnson CS, Trump DL, Lee YJ, Singh SV (2004): Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human prostate cancer cells involves c-Jun N-terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase-mediated phosphorylation of Bcl-2. *Oncogene*, 23, 5594–5606. doi: 10.1038/sj.onc.1207747.
- Xiao D, Herman-Antosiewicz A, Antosiewicz J, Xiao H, Brisson M, Lazo JS, Singh SV (2005): Diallyl trisulfide-induced G(2)-M phase cell cycle arrest in human prostate cancer cells is caused by reactive oxygen species-dependent destruction and hyperphosphorylation of Cdc25C. *Oncogene*, 24, 6256–6268. doi: 10.1038/sj.onc.1208759.
- Xiao D, Lew KL, Kim YA, Zeng Y, Hahm ER, Dhir R, Singh SV (2006a): Diallyl trisulfide suppresses growth of PC-3 human prostate cancer xenograft *in vivo* in association with Bax and

- Bak induction. *Clinical Cancer Research*, 12, 6836–6843. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1273.
- Xu B, Monsarrat B, Gairin JE, Girbal-Neuhausser E (2004): Effect of ajoene, a natural antitumor small molecule, on human 20S proteasome activity *in vitro* and in human leukemic HL60 cells. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 18, 171–180. doi: 10.1111/j.1472-8206.2004.00219.x.
- Yuan JP, Wang GH, Ling H, Su Q, Yang YH, Song Y, Tang RJ, Liu Y, Huang C (2004): Diallyl disulfide-induced G2/M arrest of human gastric cancer MGC803 cells involves activation of p38 MAP kinase pathways. *World Journal of Gastroenterology*, 10, 2731–2734.
- Zhang YW, Wen J, Xiao JB, Tallbot SG, Li GC, Xu M (2006): Induction of apoptosis and transient increase of phosphorylated MAPKs by diallyl disulfide treatment in human nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells. *Archives of Pharmacal Research*, 29, 1125–1131. doi: 10.1007/BF02969303.
- Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R (2001): The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *The EMBO Journal*, 20, 6008–6016.

Abbreviations:

AGE = aged garlic extract, CSE = cystathionine-gamma-lyase, DADS = diallyl disulfide, DAS = diallyl monosulfide, DATS = diallyl trisulfide, ERK = extracellular signal-regulated kinase, JNK = c-Jun N-terminal kinase, LDL = low-density lipoprotein, MAPK = mitogen-activated protein kinase, NFκB = nuclear factor kappa, ROS = reactive oxygen species, SAC = S-allyl cysteine, SPRC = S-propargyl cysteine, VEGF = vascular endothelial growth factor

Corresponding Author:

Ing. Markéta Dvořáková, Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Department of Veterinary Sciences, Kamýcká 129, 165 21 Prague 6-Suchbát, Czech Republic, phone: +420 224 282 932, e-mail: dvorakova2@af.czu.cz



ORGANO-SULPHUR GARLIC COMPOUNDS INFLUENCE VIABILITY OF MAMMALIAN CELLS: A REVIEW*

E. Chmelíková, D. Němeček, M. Dvořáková, I. Heroutová, M. Sedmíková

Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Prague, Czech Republic

Garlic is still in the centre of interest for its therapeutic effects. Currently, attention is focused on physiological effects of organo-sulphur garlic compounds, as alliin, allicin, diallyl sulfide (DAS), diallyl disulfide (DADS), diallyl trisulfide (DATS), and *S*-allyl cysteine (SAC), particularly on their antioxidant and anticarcinogenic effects. SAC has been studied for its ability to decrease the production of reactive oxygen species by modulation of the cell glutathione level together with antioxidative enzyme activity, and by improvement of mitochondrial functions. The main mechanism of DAS, DADS, and DATS is the induction of the internal apoptotic pathway. Garlic compounds have the ability to interfere with the signalling pathways of small gaseous signalling molecules known as gasotransmitters – nitric oxide, hydrogen sulfide, and carbon monoxide. The review presents the effect of garlic compounds on cellular oxidative stress, intrinsic apoptotic and gasotransmitter pathways and compares their effects on tumour and normal mammalian cells.

garlic products, oxidative stress, ROS, H₂S, NO, CO



doi: 10.2478/sab-2018-0002

Received for publication on July 20, 2017

Accepted for publication on August 29, 2017

INTRODUCTION

Garlic (*Allium sativum*) was, for its therapeutic effects, used as early as ancient Egypt, Rome, India, and China. References to its use are also in the Bible. It was used both to increase resistance against illnesses and for their treatment (Rivlin, 2001). Its effects are complex and it was used against heart diseases, hemorrhoids, to improve sexual fitness or against snake bites. Thanks to its effects, it is still in the centre of interest. Many studies have been carried out that support the positive effects of its use, while its impact is broad.

Currently, attention is focused particularly on individual garlic derivatives which exhibit positive physiological effects. The main studied garlic derivatives

include in particular organo-sulphur compounds, which are deemed to be the carriers of positive properties. These include in particular alliin, allicin, diallyl sulfide (DAS), diallyl disulfide (DADS), diallyl trisulfide (DATS), and *S*-allyl cysteine (SAC).

Garlic has been used since ancient times for its antimicrobial properties. Even today it is used against influenza viruses. Its antiviral effect includes not only influenza A and B viruses, but also the effect against herpes simplex virus, cytomegaloviruses, and rhinoviruses. The antibacterial effect of garlic is due to the inhibition of growth and production of bacterial toxins. This effect has been described in strains of *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Helicobacter pylori*, and *Clostridium*.

* Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Project No. QJ1510138, and by the Internal Grant Agency of the Czech University of Life Sciences Prague (CIGA), Project No. 20142049.

Garlic and garlic derivatives have bactericidal effect against bacteria that cause tooth decay and periodontitis. In addition, garlic has the ability to inhibit the growth of moulds and yeasts, including the genera *Candida*, *Trichophyton*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* or *Trichosporon*. The anti-parasitic effect was described for *Trypanosoma brucei*, *Leishmania* or the genus *Giardia* (Majewski, 2014).

The ability of garlic to lower blood pressure was demonstrated by several epidemiological studies. Garlic derivatives, particularly SAC and allicin, affect a number of factors involved in the development of hypertension, whether it is oxidative stress, nitric oxide (NO) production, angiotensin-converting enzyme activity or proliferation of vascular smooth muscle cells (Shouk et al., 2014). Garlic derivatives have the ability to lower the plasma glucose levels and therefore suppress the development of diabetes mellitus (Banerjee et al., 2003). Preventive effects against atherosclerosis are related to the decrease in plasma triglycerides, LDL, HDL, and total cholesterol, and the lowering of blood pressure of garlic consumers (Lciek et al., 2009; Ebrahimi et al., 2016).

Another described property of garlic extracts is the ability to modulate immune functions and anti-inflammatory effect mediated by stimulation of macrophages, lymphocytes, natural killer (NK) cells, and dendritic cells, and by influencing the production of cytokines and immunoglobulins (Arreola et al., 2015).

Many works have proved that garlic, and in particular sulphur compounds, are capable of inhibiting the growth of tumour cells of a variety of tumours such as gastric, breast, colon, prostate, liver, kidney, bladder, and others by various mechanisms – e.g. by influencing gene expression, inhibition of proliferation and cell cycle, inhibition of cytochrome P450 or by increasing infiltration of T lymphocytes (CD8 (+) T-Cell) into a tumour (Corzo-Martinez et al., 2007; Huang et al., 2011; Tsai et al., 2012; Ebrahimi et al., 2013; Bayan et al., 2014). DAS, DADS, and DATS are garlic compounds which gain attention due to their anticarcinogenic effect. Of these three compounds, mainly the effects of DADS include a wide variety of reactions from detoxification of carcinogenic substances through modulation of cytochrome P450-dependent monooxygenases and via induction of phase II enzymes, through suppression of DNA adduct formation, histones modification, cell cycle regulation to apoptosis induction (Khanum et al., 2004; Yi, Su, 2013).

Garlic derivatives and their biotransformation

The content of each physiologically active garlic derivative varies depending on the processing of garlic. Whole garlic bulbs contain gamma-glutamyl cysteine, from which physiologically active garlic derivatives are obtained. SAC is formed via the reaction catalyzed

by gamma-glutamyl transpeptidase in aqueous solutions and extracts. Alliin (*S*-allyl-L-cysteine sulfoxide) and methiin (*S*-methyl-L-cysteine sulfoxide) are formed by hydrolysis and oxidation. The main active ingredient of garlic is allicin which is formed via the reaction catalyzed by the enzyme alliinase, namely by the hydrolysis of alliin to allylsulfenic acid and its subsequent condensation to allicin (diallyl thiosulfinate) (Amagase, 2006; Colin-Gonzalez et al., 2012; Majewski, 2014). This is further converted into fat-soluble DAS, DADS, and DATS (Corzo-Martinez et al., 2007).

The content of particular derivatives depends on the processing of garlic cloves. Ethanol extracts obtained by extraction at temperatures below 0°C contain mainly alliin, ethanol-water extraction at 25°C provides allicin, and distillation with water vapour at 100°C leads to the conversion of alliin to DAS (Majewski, 2014). A common method of garlic processing is a long-term extraction, during which garlic is extracted by 15–20% ethanol at room temperature for a period longer than 20 months. In this manner aged garlic extract (AGE) is obtained, which is less aromatic and in which the gamma-glutamyl cysteine is converted mainly to SAC, a colourless and odourless substance, which is stable in aqueous solution with neutral or slightly acidic pH (Amagase, 2006) (Fig. 1).

Organo-sulphur garlic compounds and the effect on signalling pathways of mammalian cells

Currently, organo-sulphur garlic compounds attract attention for their ability to modulate viability of mammalian cells. The most studied garlic derivatives include alliin, allicin, SAC, DAS, DADS, and DATS. These substances influence each other in their effect. In addition to the synergistic effect, they exhibit a strong pleiotropic effect (Amagase, 2006). The reason is that garlic compounds affect a variety

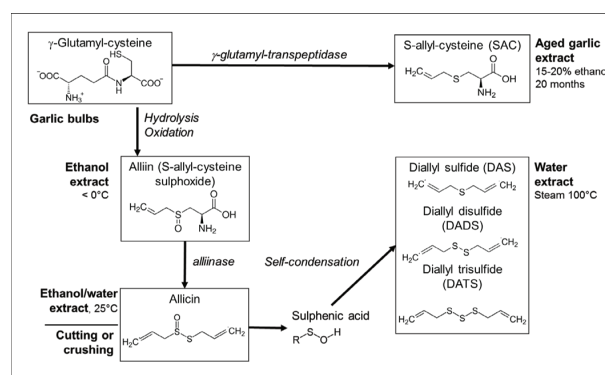


Fig. 1. Garlic derivatives and their biotransformation depending on the processing of garlic bulbs modified according to Corzo-Martinez et al. (2007)

of signalling pathways that regulate various cellular processes (Fig. 2).

Effect on the formation of reactive oxygen species (ROS). The increased intracellular level of ROS is a risk factor for a number of illnesses including cardiovascular and neurodegenerative. Due to ROS, organo-sulphur garlic compounds exhibit dual effect. They can reduce or increase intracellular levels of ROS. Alliin increases the activity of antioxidant enzymes and reduces lipid peroxidation (Banerjee et al., 2003). Antioxidant properties of allicin, which is the main component of fresh garlic extract, are facilitated by reaction products forming during the reaction with glutathione and cysteine (Prasad et al., 1996; Rabinikov et al., 2000). Alliin and allicin increase the activity of endogenous antioxidants (Banerjee et al., 2001) and inhibit lipid peroxidation (Lau, 2001).

The highest antioxidant activity among sulphur garlic derivatives has SAC, which is contained in a high concentration in AGE. SAC influences the formation of ROS by several mechanisms. One of

the ways described in endothelial cells is reducing the production of hydrogen peroxide and superoxide anion, and increasing the glutathione level by reducing the activity of superoxide dismutase and increasing activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase (Wei, Lau, 1998; Orozco-Ibarra et al., 2016). Another effect of SAC is the improvement of mitochondrial functions and the suppression of mitochondrial membrane potential reduction (Cervantes et al., 2013). Furthermore, SAC activates nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), the main control factor of the redox state (Colin-Gonzalez et al., 2012). Nrf2 acts as a regulator of glutathione, a powerful endogenous anti-oxidant (Solis et al., 2002), peroxiredoxins, proteins reducing reactive peroxides including hydrogen peroxide and peroxynitrite (Neumann et al., 2009), and heme oxygenase-1 (HO-1) which catalyzes the production of anti-inflammatory carbon monoxide (CO) (Jarmil, Agarwal, 2009).

Antioxidant properties were also described in DAS, DADS, and DATS (Amagase et al., 2001). DATS protects endothelial cells against oxidative stress by decreasing the level of ROS, it increases the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in mitochondria and improves mitochondrial function of endothelial cells (Liu et al., 2014). On the other hand, by increasing the intracellular Ca^{2+} level, DADS enhances the production of hydrogen peroxide (Park et al., 2002) and its ability to increase the production of ROS is considered to be one of the ways that DADS promotes the apoptosis of cancer cells (Filomeni et al., 2003; Lu et al., 2004).

Effect on apoptotic signalling pathways. Induction of the internal apoptotic pathway is the main mechanism by which garlic sulphur derivatives inhibit tumour cells. Cancer cells generally have a low antioxidant potential, because they form small amounts of compounds with antioxidant properties and ROS accumulation is promoted by activation of oncogenes, aberrant metabolism, mitochondrial dysfunction, and loss of the tumour suppressor gene p53 (Trachootham et al., 2009). Compounds that raise ROS levels can effectively and selectively kill a variety of tumour cell lines (Hamanaoka, Chandel, 2010). Increasing the production of ROS induced by garlic compounds therefore goes hand in hand with the activation of apoptosis (Filomeni et al., 2003; Xiao et al., 2004).

DADS increases intracellular ROS production, reduces the expression of anti-apoptotic factors, and promotes the activity of caspase-3, leading to the induction of apoptosis (Nakagawa et al., 2001; Lu et al., 2004). Nagaraj et al. (2010) found that DADS induces the expression of Apaf1, caspase-3, and FADD (Fas-associated protein with death domain) and therefore the induction of apoptosis occurs via Bax-triggered mitochondrial pathway. Furthermore,

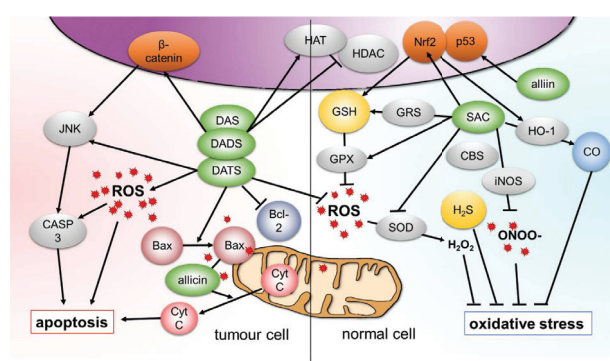


Fig. 2. Signal pathways influenced by organo-sulphur garlic compounds in normal and tumour mammalian cells

The effect of garlic compounds differs noticeably in normal and cancer cells. These compounds have antioxidative effect in normal cells but suppress ROS production and support apoptosis in tumour cells

CBS = cystathionine- β -synthase, CSE = cystathionine- γ -lyase, CASP 3 = caspase 3, CO = carbon monoxide, CytC = cytochrome C, DAS = diallyl sulfide, DADS = diallyl disulphide, DATS = diallyl trisulfide, GSH = glutathione, GPX = glutathione peroxidase, GRS = glutathione reductase, HAT = histone acetyltransferase, HDAC = histone deacetylase, H_2O_2 = hydrogen peroxide, H_2S = hydrogen sulfide, HO-1 = heme oxygenase-1, JNK = c-Jun N-terminal kinase, MAPK = mitogen-activated protein kinase, NO = nitric oxide, iNOS = inducible nitric oxide synthase, Nrf2 = nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, ONOO $^-$ = peroxynitrite, p53 = tumour suppressor gene p53, ROS = reactive oxygen species, SAC = S-allyl cysteine, SOD = superoxide dismutase

DADS enhances phosphorylation of mitogen-activated protein kinases – MAPKs, namely p38 MAPK and c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Filomeni et al., 2003; Shin et al., 2012).

An increase in the intracellular Ca^{2+} level and the associated endoplasmic reticulum stress is another trigger mechanism described in human leukemic cells, by which DADS induces activation of caspases (Park et al., 2002). Ca^{2+} is released from the endoplasmic reticulum and via the influx of phospholipase A2-sensitive channels (Chen et al., 2011). Apoptosis can be also induced through beta-catenin, the overexpression of which, in the nucleus, has been described in cancer cells (Kypura, Waxman, 2012). DADS affects the expression of active beta-catenin and thus the activation of the signalling pathway that down-regulates Bcl-2 family proteins (Huang et al., 2015).

The allyl sulfides effect on intracellular signalling of apoptotic signalling pathways correlates with the number of sulphur atoms in allyl sulfide molecule (Jan et al., 2012). DATS is more effective in inducing apoptosis in renal cells and cells of the human prostate tumours than DAS and DADS. DATS works through JNK activation and via extracellular signal-regulated kinase (ERK) hyperphosphorylation, and thus anti-apoptotic factors inactivation (Xiao et al., 2004). Furthermore, DATS causes conformational changes of pro-apoptotic factors that lead to their transfer into the mitochondria (Kim et al., 2007).

Allicin also has a similar effect, which induces apoptosis in pancreatic tumour cells due to increased production of ROS and glutathione depletion and increased caspase-3 expression, along with DNA fragmentation (Chhabria et al., 2015). Izdebska et al. (2016) described a pro-apoptotic effect of alliin on breast cancer cells. The effect of allicin has been observed in human tumour cells of the stomach. Allicin induces the transfer of pro-apoptotic factor Bax to mitochondria and the release of cytochrome C from mitochondria to the cytosol and thereby triggers apoptosis combined with DNA fragmentation (Park et al., 2005).

In contrast to tumour cells, in cardiomyocytes of diabetic rats, DADS and DATS have the ability to inhibit caspase-3 expression and by this way to suppress the apoptotic signalling pathway (Huang et al., 1985). Through the released sulfide, garlic derivatives change the ratio of pro-apoptotic and anti-apoptotic factors Bax and Bcl-2 and reduce phosphorylation and thus the activity of MAPK and JNK, which are applied in the activation of the apoptotic signalling pathway (Mukherjee et al., 2009). It is therefore obvious that the method of affecting cellular processes depends not only on the type of garlic derivative but also on the specific cell type.

Effect on gene expression and histone acetylation. Garlic sulphur compounds affect the expression

of various genes. Mousa, Mousa (2005) described the ability of alliin to increase the expression of the tumour suppressor gene *p53* and by contrast to suppress the expression of fibroblast growth factor-2 and thus slow down the growth of the human fibrosarcoma and colon tumour. Gene expression is modulated by garlic derivatives via histone acetylation, a key process in the activation of transcription. DADS increases the histone acetyltransferase activity and induces histone hyperacetylation in prostate cancer cells and thereby promotes the expression of anti-proliferation genes (Yi, Su, 2013). The induction of apoptosis also correlates with histone acetylation (Arunkumar et al., 2007). The increase in the activity of histone acetyltransferase correlates with a decrease in the activity of histone deacetylase (HDAC). This characteristic was described in DADS and its metabolite – allyl mercaptan (Druesne et al., 2004). SAC also has the potential to induce histones acetylation, although a significant effect on HDAC has not been detected (Lea et al., 2001).

Effect on signalling pathways of gasotransmitters. The effects of garlic derivatives are, in various types of mammalian tissues and cells, mediated by their ability to interfere with the signalling pathways of small gaseous signalling molecules known as gasotransmitters. Gasotransmitters include NO, CO, and hydrogen sulfide (H_2S). In the cell, gasotransmitters are formed by reactions which are catalyzed by enzymes. NO is produced in cells of amino acid L-arginine by NO synthase (NOS) enzyme activity, which can be found in three isoforms. Neuronal NOS (nNOS) and endothelial NOS (eNOS) generate small amounts of NO, and inducible NOS (iNOS), on the other hand, generates large amounts of NO from which peroxynitrites and S-nitrosothiols are created (Griffith, Stuehr, 1995; Snyder, 1995; Broillet, 1999). CO is endogenously formed via heme-oxygenase known in two isoforms – HO-1 and HO-2 (Maines et al., 1998), which differ in enzyme kinetics. HO-1 is an inducible isoform, which is part of the system to protect cells against oxidative stress. HO-2 is the constitutive form with a constant production of CO (Nemecsek et al., 2017).

The last of the three gasotransmitters, H_2S , is formed from the amino acid L-cysteine via the reaction catalyzed by cystathionine- γ -synthase (CBS), cystathionine- γ -lyase (CSE) (Wang, 2002), and 3-mercaptopyruvate-sulfurtransferase (3-MPST) (Shibuya et al., 2009). The majority of physiologically produced H_2S occurs in the cells through the activity of CBS and CSE.

According to *in vitro* studies, garlic derivatives reduce the expression of iNOS and therefore contribute to the reduction of peroxynitrite formation and the suppression of oxidative stress in cells (Majewski, 2014). SAC affects the activity of HO-1 and CO pro-

duction via the regulation of Nrf2 and in this way reduces ROS. The effect of AGE on oxidative stress has been described. AGE, beside other things, affects the expression of iNOS and HO-2 (Griffin et al., 1989; Jarmi, Agarwal, 2009).

Most is known about the effect of garlic sulphur derivatives on H₂S production. SAC not only directly increases CSE activity, but also serves as a substrate for intracellular H₂S-generating reactions catalyzed by CSE (Chuah et al., 2007). The increased production of H₂S via the increased expression and activity of CBS and CSE enzymes was described in DATS in rat cardiomyocytes (Louis et al., 2012; Tsai et al., 2015), and human (Chen et al., 2016) and mouse liver cells (Iciek et al., 2012). DADS and DATS increase total sulphane sulphur level and improve antioxidant and regulatory capacities of the cells (Iciek et al., 2012). The increased production of H₂S in these cells then suppresses oxidative stress and the activation of the apoptotic signalling pathway. A similar effect has been described in SAC, whose administration to laboratory rats with artificially induced myocardial infarction decreased their mortality and heart damage. The proof of the fact that H₂S contributes to the SAC effect is that CSE inhibition suppressed this positive effect of SAC and H₂S donor improves the ischemia affected cardiomyocyte function (Sun et al., 2015). H₂S suppresses apoptosis in rat liver cells by reducing the activity of MAPK and JNK (Yuan et al., 2017) and affects the ratio of pro-apoptotic and anti-apoptotic factors Bax and Bcl-2 cells (Filomeni et al., 2003; Lu et al., 2004). It is therefore likely that the effect of sulphur garlic derivatives is mediated via increased production of H₂S in the cells.

CONCLUSION

Garlic compounds participate in the regulation of many signalling cascades from affecting the extent of oxidative stress, through regulation of the expression of genes to the regulation of apoptosis. This pleiotropic effect is given by the fact that the way of cellular processes modulation is dependent on garlic bulb processing and also specific mammalian cell metabolism. The method of processing is a critical factor influencing the presence and ratio of physiologically active garlic derivatives. It is evident that the effect of organo-sulphur garlic compounds on the cellular oxidative stress and the intrinsic apoptotic pathway is dependent upon the particular type and metabolism of the cell, and to the extent that the effect on these processes may be completely opposite.

REFERENCES

Amagase H (2006): Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *The Journal of Nutrition*, 136, 716S–725S.

- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y (2001): Intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of Nutrition*, 131, 955S–962S.
- Arreola R, Quintero-Fabian S, Lopez-Roa RI, Flores-Gutierrez EO, Reyes-Grajeda JP, Carrera-Quintanar L, Ortuno-Sahagun D (2015): Immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic compounds. *Journal of Immunology Research*, 2015, 401630. doi: 10.1155/2015/401630.
- Arunkumar A, Vijayababu MR, Gunadharini N, Krishnamoorthy G, Arunakaran J (2007): Induction of apoptosis and histone hyperacetylation by diallyl disulfide in prostate cancer cell line PC-3. *Cancer Letters*, 251, 59–67. doi: 10.1016/j.canlet.2006.11.001.
- Banerjee SK, Maulik M, Manchanda SC, Dinda AK, Das TK, Maulik SK (2001): Garlic-induced alteration in rat liver and kidney morphology and associated changes in endogenous antioxidant status. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 793–797. doi: 10.1016/S0278-6915(01)00018-7.
- Banerjee SK, Mukherjee PK, Maulik SK (2003): Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly. *Phytotherapy Research*, 17, 97–106. doi: 10.1002/ptr.1281.
- Bayan L, Koulivand PH, Gorji A (2014): Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4, 1–14.
- Broillet MC (1999): S-Nitrosylation of proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55, 1036–1042. doi: 10.1007/s000180050354.
- Cervantes MI, de Oca Balderas PM, de Jesus Gutierrez-Banos J, Orozco-Ibarra M, Fernandez-Rojas B, Medina-Campos ON, Espinoza-Rojo M, Ruiz-Tachiquin M, Ortiz-Plata A, Salazar MI, Rubio-Osornio M, Castaneda-Saucedo E, Pedraza-Chaverri J, Calzada F, Aguilera P (2013): Comparison of antioxidant activity of hydroethanolic fresh and aged garlic extracts and their effects on cerebral ischemia. *Food Chemistry*, 140, 343–352. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.02.053.
- Chen LY, Chen Q, Zhu XJ, Kong DS, Wu L, Shao JJ, Zheng SZ (2016): Diallyl trisulfide protects against ethanol-induced oxidative stress and apoptosis via a hydrogen sulfide-mediated mechanism. *International Immunopharmacology*, 36, 23–30. doi: 10.1016/j.intimp.2016.04.015.
- Chen WC, Hsu SS, Chou CT, Kuo CC, Huang JK, Fang YC, Chang HT, Tsai JY, Liao WC, Wang BW, Shieh P, Kuo DH, Jan CR (2011): Effect of diallyl disulfide on Ca²⁺ movement and viability in PC3 human prostate cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 25, 636–643. doi: 10.1016/j.tiv.2010.12.015.
- Chhabria SV, Akbarsha MA, Li AP, Kharkar PS, Desai KB (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, 1388–1409. doi: 10.1007/s10495-015-1159-4.
- Chuah SC, Moore PK, Zhu YZ (2007): S-Allylcysteine mediates cardioprotection in an acute myocardial infarction rat model via a hydrogen sulfide-mediated pathway. *American*

- Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology, 293, H2693–H2701. doi: 10.1152/ajpheart.00853.2007.
- Colin-Gonzalez AL, Santana RA, Silva-Islas CA, Chanez-Cardenas ME, Santamaria A, Maldonado PD (2012): The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract- and S-allylcysteine-induced protection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, Article ID 907162. doi: 10.1155/2012/907162.
- Corzo-Martinez M, Corzo N, Villamiel M (2007): Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 609–625. doi: 10.1016/j.tifs.2007.07.011.
- Druesne N, Pagniez A, Mayeur C, Thomas M, Cherbuy C, Duce PH, Martel P, Chaumontet C (2004): Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21waf1/cip1 expression in human colon tumor cell lines. *Carcinogenesis*, 25, 1227–1236. doi: 10.1093/carcin/bgh123.
- Ebrahimi M, Hassan ZM, Mostafaie A, Mehrjardi NZ, Ghazanfari T (2013): Purified protein fraction of garlic extract modulates cellular immune response against breast transplanted tumors in BALB/c mice model. *Cellular Journal*, 15, 65–74.
- Ebrahimi T, Behdad B, Abbasi MA, Rabati RG, Fayyaz AF, Behnod V, Asgari A (2016): High doses of garlic extract significantly attenuated the ratio of serum LDL to HDL level in rat fed with hypercholesterolemia diet. *Diagnostic Pathology*, 11, 119. doi: 10.1186/s13000-016-0557-4.
- Filomeni G, Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR (2003): Reactive oxygen species dependent c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide. *Cancer Research*, 63, 5940–5949.
- Griffin GE, Leung K, Folks TM, Kunkel S, Nabel GJ (1989): Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF- κ B. *Nature*, 339, 70–73. doi: 10.1038/339070a0.
- Griffith OW, Stuehr DJ (1995): Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annual Review of Physiology*, 57, 707–736. doi: 10.1146/annurev.ph.57.030195.003423.
- Hamanaka RB, Chandel NS (2010): Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences*, 35, 505–513. doi: 10.1016/j.tibs.2010.04.002.
- Huang J, Yang B, Xiang T, Peng W, Qiu Z, Wan J, Zhang L, Li H, Li H, Ren G (2015): Diallyl disulfide inhibits growth and metastatic potential of human triple-negative breast cancer cells through inactivation of the β -catenin signaling pathway. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59, 1063–1075. doi: 10.1002/mnfr.201400668.
- Huang LC, Villar-Palasi C, Kochevar LE, Charlton JP, King LS, Huang CH (1985): Phosphorylation of the regulatory subunit of type I cyclic AMP-dependent protein kinase by its catalytic subunit. *Journal of Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research*, 10, 485–497.
- Huang YS, Xie N, Su Q, Su J, Huang C, Liao QJ (2011): Diallyl disulfide inhibits the proliferation of HT-29 human colon cancer cells by inducing differentially expressed genes. *Molecular Medicine Reports*, 4, 553–559. doi: 10.3892/mmr.2011.453.
- Iciek M, Kwiecien I, Wlodek L (2009): Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50, 247–265. doi: 10.1002/em.20474.
- Iciek MB, Kowalczyk-Pachel D, Kwiecien I, Dudek MB (2012): Effects of different garlic-derived allyl sulfides on peroxidative processes and anaerobic sulfur metabolism in mouse liver. *Phytotherapy Research*, 26, 425–431. doi: 10.1002/ptr.3572.
- Izdebska M, Grzanka D, Gagat M, Halas-Wisniewska 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, 3084–3093. doi: 10.3892/or.2016.4628.
- Jan CR, Lo HR, Chen CY, Kuo SY (2012): Effect of allyl sulfides from garlic essential oil on intracellular Ca^{2+} levels in renal tubular cells. *Journal of Natural Products*, 75, 2101–2107. doi: 10.1021/np3005248.
- Jarmi T, Agarwal A (2009): Heme oxygenase and renal disease. *Current Hypertension Reports*, 11, 56–62. doi: 10.1007/s11906-009-0011-z.
- Khanum F, Anilakumar KR, Viswanathan KR (2004): Anticarcinogenic properties of garlic: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 479–488. doi: 10.1080/10408690490886700.
- Kim YA, Xiao D, Xiao H, Powolny AA, Lew KL, Reilly ML, Zeng Y, Wang Z, Singh SV (2007): Mitochondria-mediated apoptosis by diallyl trisulfide in human prostate cancer cells is associated with generation of reactive oxygen species and regulated by Bax/Bak. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6, 1599–1609. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0754.
- Kypta RM, Waxman J (2012): Wnt/ β -catenin signalling in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 9, 418–428. doi: 10.1038/nrurol.2012.116.
- Lau BHS (2001): Suppression of LDL oxidation by garlic. *The Journal of Nutrition*, 131, 985S–988S.
- Lea MA, Randolph VM, Lee JE, Des Bordes C (2001): Induction of histone acetylation in mouse erythroleukemia cells by some organosulfur compounds including allyl isothiocyanate. *International Journal of Cancer*, 92, 784–789. doi: 10.1002/ijc.1277.
- Liu LL, Yan L, Chen YH, Zeng GH, Zhou Y, Chen HP, Peng WJ, He M, Huang QR (2014): A role for diallyl trisulfide in mitochondrial antioxidative stress contributes to its protective effects against vascular endothelial impairment. *European Journal of Pharmacology*, 15, 23–31. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.01.010.
- Louis XL, Murphy R, Thandapilly SJ, 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. doi: 10.1186/1472-6882-12-140.

- Lu HF, Sue CC, Yu CS, Chen SC, Chen GW, Chung JG (2004): Diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis undergo caspase-3 activity in human bladder cancer T24 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1543–1552. doi: 10.1016/j.fct.2003.06.001.
- Maines MD, Polevoda B, Coban T, Johnson K, Stoliar S, Huang TJ, Panahian N, Cory-Slechta DA, Mc Coubrey Jr WK (1998): Neuronal overexpression of heme oxygenase-1 correlates with an attenuated exploratory behavior and causes an increase in neuronal NADPH diaphorase staining. *Journal of Neurochemistry*, 70, 2057–2069. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.70052057.x.
- Majewski M (2014): *Allium sativum*: facts and myths regarding human health. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 65, 1–8.
- Mousa AS, Mousa SA (2005): Anti-angiogenesis efficacy of the garlic ingredient alliin and antioxidants: role of nitric oxide and p53. *Nutrition and Cancer*, 53, 104–110. doi: 10.1207/s15327914nc5301_12.
- Mukherjee S, Lekli I, Goswami S, Das DK (2009): Freshly crushed garlic is a superior cardioprotective agent than processed garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7137–7144. doi: 10.1021/jf901301w.
- Nagaraj NS, Anilakumar KR, Singh OV (2010): Diallyl disulfide causes caspase-dependent apoptosis in human cancer cells through a Bax-triggered mitochondrial pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21, 405–412. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.01.015.
- Nakagawa H, Tsuta K, Kiuchi K, Senzaki H, Tanaka K, Hioki K, Tsubura A (2001): Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 22, 891–897. doi: 10.1093/carcin/22.6.891.
- Nemecek D, Dvorakova M, Sedmikova M (2017): Heme oxygenase/carbon monoxide in the female reproductive system: an overlooked signalling pathway. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 8, 1–12.
- Neumann CA, Cao J, Manevich Y (2009): Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. *Cell Cycle*, 8, 4072–4078. doi: 10.4161/cc.8.24.10242.
- Orozco-Ibarra M, Munoz-Sanchez J, Zavala-Medina ME, Pineda B, Magana-Maldonado R, Vazquez-Contreras E, Maldonado PD, Pedraza-Chaverii J, Chanez-Cardenas ME (2016): Aged garlic extract and S-allylcysteine prevent apoptotic cell death in a chemical hypoxia model. *Biological Research*, 49, 7. doi: 10.1186/s40659-016-0067-6.
- Park EK, Kwon KB, Park KI, Park BH, Jhee EC (2002): Role of Ca²⁺ in diallyl disulfide-induced apoptotic cell death of HCT-15 cells. *Experimental and Molecular Medicine*, 34, 250–257.
- Park SY, Cho SJ, Kwon HC, Lee KR, Rhee DK, Pyo S (2005): Caspase independent cell death by allicin in human epithelial carcinoma cells: involvement of PKA. *Cancer Letters*, 224, 123–132. doi: 10.1016/j.canlet.2004.10.009.
- Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Raney BL (1996): Evaluation of hydroxyl radical scavenging property of garlic. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 154, 55–63. doi: 10.1007/BF00248461.
- Rabinkov A, Miron T, Mirelman D, Wilchek M, Glozman S, Yavin E, Weiner L (2000): S-Allylmercaptogluthathione: the reaction product of allicin with glutathione possesses SH-modifying and antioxidant properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, 1499, 144–153. doi: 10.1016/S0167-4889(00)00119-1.
- Rivlin RS (2001): Historical perspective on the use of garlic. *The Journal of Nutrition*, 131, 951S–954S.
- 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 & Redox Signaling*, 11, 703–714. doi: 10.1089/ars.2008.2253.
- Shin DY, Kim GY, Lee JH, Choi BT, Yoo YH, Choi YH (2012): Apoptosis induction of human prostate carcinoma DU145 cells by diallyl disulfide via modulation of JNK and PI3K/AKT signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 14158–14171. doi: 10.3390/ijms131114158.
- Shouk R, Abdou A, Shetty K, Sarkar D, Eid AH (2014): Mechanisms underlying the antihypertensive effects of garlic bioactives. *Nutrition Research*, 34, 106–115. doi: 10.1016/j.nutres.2013.12.005.
- Snyder SH (1995): Nitric oxide. No endothelial NO. *Nature*, 377, 196–197. doi: 10.1038/377196a0.
- Solis WA, Dalton TP, Dieter MZ, Freshwater S, Harrer JM, He L, Shertzer HG, Nebert DW (2002): Glutamate-cysteine ligase modifier subunit: mouse Gclm gene structure and regulation by agents that cause oxidative stress. *Biochemical Pharmacology*, 63, 1739–1754. doi: 10.1016/S0006-2952(02)00897-3.
- Sun YG, Wang XY, Chen X, Shen CX, Li YG (2015): Hydrogen sulfide improves cardiomyocytes electrical remodeling post ischemia/reperfusion injury in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8, 474–481.
- Trachootham D, Alexandre J, Huang P (2009): Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 579–591. doi: 10.1038/nrd2803.
- Tsai CW, Chen HW, Sheen LY, Lii CK (2012): Garlic: health benefits and actions. *BioMedicine*, 2, 17–29. doi: 10.1016/j.biomed.2011.12.002.
- Tsai CY, Wen SY, Shibu MA, Yang YC, Peng H, Wang B, Wei YM, Chang HY, Lee CY, Huang CY, Kuo WW (2015): Diallyl trisulfide protects against high glucose-induced cardiac apoptosis by stimulating the production of cystathionine gamma-lyase-derived hydrogen sulfide. *International Journal of Cardiology*, 195, 300–310. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.05.111.
- Wang R (2002): Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB Journal*, 16, 1792–1798. doi: 10.1096/fj.02-0211hyp.
- Wei ZH, Lau BHS (1998): Garlic inhibits free radical generation and augments antioxidant enzyme activity in vascular en-

- dothelial cells. *Nutrition Research*, 18, 61–70. doi: 10.1016/S0271-5317(97)00200-5.
- Xiao D, Choi S, Johnson DE, Vogel VG, Johnson CS, Trump DL, Lee YJ, Singh SV (2004): Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human prostate cancer cells involves c-Jun N-terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase-mediated phosphorylation of Bcl-2. *Oncogene*, 23, 5594–5606. doi: 10.1038/sj.onc.1207747.
- Yi L, Su Q (2013): Molecular mechanisms for the anti-cancer effects of disulfide. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 362–370. doi: 10.1016/j.fct.2013.04.001.
- Yuan Y, Zheng J, Zhao T, Tang X, Hu N (2017): Hydrogen sulfide alleviates uranium induced acute hepatotoxicity in rats: role of antioxidant and antiapoptotic signaling. *Environmental Toxicology*, 32, 581–593. doi: 10.1002/tox.22261.

List of abbreviations: AGE = aged garlic extract, CBS = cystathionine- β -synthase, CSE = cystathionine- γ -lyase, CO = carbon monoxide, DAS = diallyl sulfide, DADS = diallyl disulfide, DATS = diallyl trisulfide, H₂S = hydrogen sulfide, HO = heme oxygenase, JNK = c-Jun N-terminal kinase, MAPK = mitogen-activated protein kinase, NO = nitric oxide, NOS = nitric oxide synthase, SAC = *S*-allyl cysteine, ROS = reactive oxygen species

Corresponding Author:

prof. Mgr. Ing. Markéta Sedmíková, Ph.D., Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Department of Veterinary Sciences, Kamýcká 129, 165 00, Prague 6-Suchbát, Czech Republic, phone: + 420 224 382 933, e-mail: sedmikova@af.czu.cz
