

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Vliv sirných sloučenin česneku na expresi markerů časně  
apoptózy u prasečích oocytů**

Diplomová práce

**Autor práce: Martina Trojanová**

**Vedoucí práce: Ing. Jan Nevoral, Ph.D**

© 2015 v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Vliv sirných sloučenin česneku na expresi markerů časně apoptózy u prasečích oocytů“ vypracovala samostatně a použila pouze zdroje, které cituji a uvádím v použité literatuře.

V Praze dne 10. 4. 2015

---

### **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala Markétě Dvořákové a Honzovi Nevoralovi za ochotu, trpělivost a cenné rady při psaní mé diplomové práce. Poděkovat za pomoc bych také chtěla kamarádce Karolíně Klinovské a v neposlední řadě své mamince za všestrannou podporu nejen při psaní diplomové práce.

## Souhrn

Prasečí oocyty jsou pro svou ekonomickou dostupnost a jednoduché získávání hojně využívány pro *in vitro* kultivace. Na poli reprodukčních biotechnologií je kvalita oocytů jednou ze zásadních podmínek úspěšné kultivace a s rozvojem těchto disciplín se nároky na kvalitu oocytů zvyšují.

V oocytech přirozeně probíhají procesy spojené se zráním, potažmo stárnutím oocytů. Prvotním jevem, který ovlivňuje využitelnost oocytů pro *in vitro* kultivace je apoptóza, programovaná buněčná smrt, postihující také zrající oocyty. K apoptóze dochází často v důsledku zvýšené produkce reaktivních forem kyslíku. Příjem antioxidantů z vnějšího prostředí může pomoci těmto nežádoucím vlivům předejít. Mezi látky, které mírní projevy apoptózy patří sирné sloučeniny obsažené v česneku, zejména S-allyl cystein (SAC) s vysokým antioxidantním potenciálem.

Hypotézou této diplomové práce je, že sирné sloučeniny česneku pozitivně ovlivňují životaschopnost zrajících prasečích oocytů ovlivněním exprese faktorů zapojených do regulace apoptózy. Cílem bylo prokázat vliv SAC (0,1; 0,5 a 1,0 mM) na průběh meiotického zrání prasečích oocytů a expresi apoptotických faktorů ve zrajících oocytech po 24 a 48 hod. kultivace. Výsledky pokusů byly statisticky zpracovávány v programu SAS 9.1 za pomoci parametrického testu ANOVA (t-test).

Výsledky prokázaly, že SAC v jakékoli koncentraci neovlivnil průběh meiotického zrání po 24 ani po 48 hod. *in vitro* kultivace. Expese proteinu Bcl-2 po 24 i 48 hod. kultivaci se SAC oproti kontrolní skupině kolísala v závislosti na přidaném množství SAC, v případě proteinu Bax klesla po 24 hod. i 48 hod. kultivaci. Výsledky 24 hod. kultivace oocytů se SAC prokázaly, že Bcl-2 a Bax jsou na sobě závislé a vyskytují se současně, popřípadě v heterodimerech. Po 24 hod. kultivaci se paralelní výskyt a překryv faktorů Bcl-2 a Bax oproti kontrole snížil, naopak po 48 hod. kultivaci stoupl.

Provedené experimenty potvrdily hypotézu, že SAC ovlivňuje expresi Bcl-2 a Bax a míru jejich výskytu a překryvu. Bylo by vhodné provést navazující experiment k objasnění distribuce proteinů z rodiny Bcl-2 na následný embryonální vývoj po *in vitro* oplození těchto oocytů.

**Klíčová slova:** oocyt, meiotické zrání, apoptóza, S-allyl cystein, Bax, Bcl-2

## Summary

Porcine oocytes are frequently used for *in vitro* cultivation due to their economic availability and easy retrieval. Quality of the oocytes is an essential factor in the field of reproductive biotechnologies and with the progress of these disciplines.

Maturation and associated aging are naturally occurring processes in the oocyte. The main factor affecting their use for *in vitro* cultivation is a programmed cell death, so-called apoptosis, which often happens due to an increase in production of reactive oxygen species. An intake of antioxidant molecules from the surrounding environment can counterbalance the detrimental effects. Among others, organic constituents of fresh garlic, especially S-Allyl cysteine (SAC), have high antioxidative effect lowering the apoptosis demonstration.

Presented study is designed to assess the hypothesis of garlic sulphur compounds increasing the viability of maturing porcine oocytes by affecting the expression of apoptosis regulating factors. The aim was to prove the influence of SAC (0,1; 0,5 and 1,0 mM ) on the process of meiotic maturation and the expression of apoptotic factors in maturing porcine oocytes after 24 and 48 hours of cultivation. The data was statistically analysed by parametric ANOVA followed by t-test in SAS 9.1 software.

The results show that SAC in any concentration does not affect the process of meiotic maturation after 24 or 48 hours of *in vitro* cultivation. Expression of Bcl-2 protein after 24 and 48 hours of cultivation with SAC varied, depending on the amount of added SAC, and the expression of Bax protein decreased after both 24 and 48 hours of cultivation with SAC. The data after 24 hours of co-cultivation of porcine oocytes with SAC show that Bcl-2 and Bax are dependent on each other and appear simultaneously, or in the form of heterodimers. The parallel occurrence and overlap of Bcl-2 and Bax factors compared to a control group decreased after 24 hours incubation and increased after 48 hours of incubation.

Performed experiments confirmed the hypothesis of SAC affecting the expression of Bcl-2 and Bax and the degree of their occurrence and overlap. It would be advisable to perform following experiments to determine the effect of the distribution of Bcl-2 protein on the embryonal development following *in vitro* fertilization of treated oocytes.

**Key words:** oocyte, meiotic maturation, apoptosis, S-allyl cysteine, Bax, Bcl-2

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>7</b>
<b>2 Hypotéza .....</b>	<b>8</b>
<b>3 Cíle.....</b>	<b>8</b>
<b>4 Literární rešerše.....</b>	<b>9</b>
<b>4.1 Oogeneze .....</b>	<b>9</b>
4.1.1 Fáze množení .....	9
4.1.2 Fáze růstu .....	11
4.1.3 Fáze zrání .....	14
<b>4.2 Buněčný stres v průběhu meiotického zrání oocytů .....</b>	<b>20</b>
<b>4.3 Apoptóza .....</b>	<b>22</b>
4.3.1 Bcl-2 proteiny.....	25
4.3.2 Kaspázy .....	27
<b>4.4 Účinky sирných sloučenin česneku v organismu .....</b>	<b>27</b>
4.4.1 Biosyntéza a metabolismus biologicky aktivních látek česneku.....	28
4.4.2 Antioxidativní aktivita sирných sloučenin česneku.....	29
<b>5 Materiál a metody .....</b>	<b>32</b>
<b>5.1 Aspirace a selekce oocytů pro experimentální účely .....</b>	<b>32</b>
<b>5.2 Vyhodnocení stádia meiotického zrání.....</b>	<b>32</b>
<b>5.3 Vyhodnocení exprese markerů časné apoptózy.....</b>	<b>33</b>
<b>5.4 Analýza obrazu.....</b>	<b>33</b>
<b>5.5 Statistická analýza.....</b>	<b>34</b>
<b>6 Výsledky.....</b>	<b>35</b>
<b>6.1 Vliv S-allyl cysteinu na průběh jaderného zrání.....</b>	<b>35</b>
<b>6.2 Vliv S-allyl cysteinu na expresi markerů časné apoptózy ve zrajících oocytech .</b>	<b>37</b>
6.2.1 Vliv S-allyl cysteinu na expresi Bcl-2 ve zrajících oocytech .....	37
6.2.2 Vliv S-allyl cysteinu na expresi Bax ve zrajících oocytech .....	39
6.2.3 Kolokalizace Bcl-2 a Bax.....	41
<b>7 Diskuze .....</b>	<b>45</b>
<b>8 Závěr .....</b>	<b>48</b>
<b>9 Seznam použité literatury .....</b>	<b>49</b>

# 1 Úvod

Pro biotechnologie užívané v reprodukci je zásadním předpokladem pro práci dostatečný počet plnohodnotných, vývojově kompetentních oocytů. Tyto oocyty dozrávají v *in vitro* podmínkách a následně jsou používány pro *in vitro* oplození, pro transgenezi nebo klonování. Během *in vitro* zrání oocytů se může kromě fyziologicky probíhajících biochemických změn odehrát řada negativně působících procesů, které ovlivní vývojovou kompetenci oocytů a tím i jejich kvalitu a životaschopnost. Pokles životaschopnosti oocytů vede k aktivaci pro-apoptotických signálních drah, které vedou k poklesu kvality oocytu a jeho dalšího použití pro účely biotechnologií.

Jedním ze způsobů, jak potlačit negativní změny buněk kultivovaných v *in vitro* podmínkách, je použití látek s anti-oxidační aktivitou. V současné době jsou intenzivně studovanou skupinou takových látek sirné sloučeniny česneku, které by mohly ovlivňovat expresi faktorů zapojených do regulace apoptózy. Analýza a využití těchto látek v postupech kultivace buněk a oocytů *in vitro* nabízí možnost snížení oxidačního stresu, potlačení projevů časně apoptózy a tak zvýšení kvality oocytů zrajících v podmínkách *in vitro*. Vliv sirných sloučenin česneku na zrání oocytů se stal předměrem zkoumání této diplomové práce.

## 2 Hypotéza

Pro tuto práci byla stanovena hypotéza, že sirné sloučeniny česneku pozitivně ovlivňují životaschopnost zrajících prasečích oocytů ovlivněním exprese faktorů zapojených do regulace apoptózy.

## 3 Cíle

Cílem práce bylo prokázat vliv S-allyl cysteinu, sirné sloučeniny česneku, na:

- průběh zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách
- expresi anti-apoptického faktoru Bcl-2 ve zrajících oocytech
- expresi pro-apoptického faktoru Bax ve zrajících oocytech
- vzájemný poměr a společnou distribuci Bcl-2 a Bax ve zrajících oocytech



## 4 Literární rešerše

Pro biotechnologie užívané v reprodukci je zásadním předpokladem pro práci dostatečný počet plnohodnotných, vývojově kompetentních oocytů. Znalost morfologických a biochemických změn v průběhu oogeneze oocyty je nezbytná k zajištění efektivity *in vitro* postupů.

### 4.1 Oogeneze

Oogeneze je několikafázový proces, během kterého se množí oogonie a v další fázi se vyvíjí oocyty, které rostou, dozrávají a získávají fertilizační schopnost. Počet jejich chromozomů se během oogeneze, přesněji ve fázi meiotického zrání, redukuje z diploidního na haploidní (Albertini and Wassarman,1994). *In vivo* se na korové oblasti vaječníků tvoří folikuly, které jsou tvořené folikulárními buňkami. Uvnitř jednotlivých folikulů se nachází oocyt prodělávající změny komplexně označované jako oogeneze.

U savců je oogeneze zahájena již ve fetálním vývoji, pokračuje u pohlavně dospělé samice v závislosti na druhu několik měsíců až let, a končí obdobím klimakteria. Proces oogeneze začíná primordiálními zárodečnými buňkami (PGCs - Primordial Germ Cells) a zahrnuje řadu buněčných změn od přeměny oogonií v oocyty, vyvíjející se ještě v plodu, po plně dorostlé a dozralé oocyty, které se tvoří v těle pohlavně dospělých samic (Albertini and Wassarman,1994). Obecně, formování oocytů zahrnuje několik fází: vznik PGCs, jejich migraci do místa budoucích gonád a kolonizaci gonád, diferenciaci PGCs v oogonie, množení oogonií, zahájení meiózy, zastavení meiózy ve fázi diplotene profáze I (Van den Hurk and Zhao, 2004).

#### 4.1.1 Fáze množení

Oocyty pochází z malého počtu kmenových buněk extragonadálního původu, primordiálních zárodečných buněk PGCs (Pregerminal Cells), jejichž tvorba u embrya značí začátek oogeneze.

Místem vzniku těchto buněk je proximální epiblast v blízkosti extra-embryonálního ektodermu, odkud se dostávají do kaudálního konce primitivního proužku. Z tohoto místa migrují krví do žloutkového vaku a do allantois, kde jsou patrné již u osmidenního myšího zárodka (Albertini and Wassarman,1994). Odtud putují pasivním transportem

do endodermálního epitelu zadního střeva na kaudálním konci embrya. Nakonec se díky chemotaxi améboidním pohybem a samotnému růstu embrya dostávají dorzálním mezenteriem zadního prvostřeva k vznikajícím genitálním lištám na ventrální straně mezonefros.

O množství PGCs vznikajících v epiblastu rozhoduje koncentrace BMP (Bone Morphogenetic Proteins), proteinů spadajících do rodiny TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ). BMP-2 je produkován v endodermu, BMP-4 a BMP-8b se tvoří v extra-embryonálním ektodermu. Je prokázáno, že u embryí s nízkou koncentrací BMP-4 a BMP-8b se zformoval nedostatečný počet PGCs (Van den Hurk and Zhao, 2004).

PGCs se mitoticky dělí a u 11-12 denního myšího embrya jejich počet dosahuje zhruba 5000. PGCs se množí pouze další 2-3 dny po doputování do genitálních lišt, poté se redukují a méně než 1% z nich dosáhne S fáze buněčného cyklu.

U embryí prasat jsou PGCs pozorovatelné ještě před vznikem gonád (Albertini and Wassarman, 1994). Dříve byl počet PGCs vzniklých během embryogeneze považován za konečný, avšak před lety začala být tato teorie zpochybňována a existuje předpoklad, že tyto buňky se tvoří i v těle dospělých samic (Johnson *et al.*, 2004).

Po dosažení povrchu epitelu gonád PGCs plně kolonizují ovárium (Albertini and Wassarman, 1994) a vykazují vysokou úroveň mitotické a transkripční aktivity (Van den Hurk and Zhao, 2004). Počet mitotických cyklů je druhově specifický. Mitotické dělení PGCs a jejich diferenciaci v korové vrstvě vaječníku vede ke zformování skupin oogonií, takzvaných klastrů. Klastry obsahují obvykle dvě nebo více oogonií (Jagarlamudi and Rajkovic, 2011), které jsou, vzhledem k neúplné cytokinezi, vzájemně spojeny intercelulárními cytoplazmatickými můstky (Van den Hurk and Zhao, 2004) tak, aby byla umožněna komunikace sousedících buněk (Jagarlamudi and Rajkovic, 2011).

Po posledním mitotickém dělení se klastry začínají rozpadat (Jagarlamudi and Rajkovic, 2011) a zhruba 5% oogonií vstoupí do preleptotene (interfáze), kdy nastává poslední replikace DNA před meiozou (Albertini and Wassarman, 1994). Následně se oogonie transformují na primární oocyty, které vstoupí do stadia leptotene profáze prvního meiotického dělení (Fair, 2003). Počet primárních oocytů je dán předchozím dělením oogonií, neboť oocyty samy nemají schopnost mitózy (Albertini and Wassarman, 1994).

#### 4.1.2 Fáze růstu

Po posledním mitotickém dělení a po rozpadu klastrů na vaječnicku se nově vzniklé primární oocyty začínají obklopotvat intaktní *basal lamina* a jednou vrstvou 4-8 pre-granulózních buněk, které prolifерují a na vaječnicku tak vzniká komplex označovaný jako primordiální folikul (Fair, 2003). S formováním primordiálního folikulu je u myši spojován oocytární gen *Figa*, který kóduje transkripci faktoru regulujícího dvě kaskády. Jedna koordinuje expresi strukturálních genů proteinů *zony pellucidy* (Eppig, 2001) a druhá řídí tvorbu jednoho či více faktorů produkovaných oocytem, nezbytných pro počáteční organizaci primordiálních folikulů (Fair, 2003). Vztah mezi těmito dvěma kaskádami není prokázán (Eppig, 2001). Formování primordiálního folikulu je také stimulováno faktorem BMP-7, který podporuje dělení granulóznic buněk. Jednotlivé primordiální folikuly se začínají objevovat zároveň se zahájením meiózy (Van den Hurk and Zhao, 2004), konkrétně u prasat se na ovariu plodu vyskytují 68. den *post coitum*, u krav je to zhruba 90. den vývoje embrya (Fair, 2003). Primordiální folikuly jsou nejmenšími folikuly, které se na korové vrstvě vaječnicku nachází (Jagarlamundi and Rajkovic, 2011).

Meiotická profáze, do níž oocyty v primordiálním folikulu vstupují, má několik stadií: leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze. Jednotlivé fáze se liší různou konfigurací chromozomů a stupněm jejich kondenzace (Fair, 2003). Savčí oocyty projdou prvními třemi fázemi profáze I a jsou zastaveny v diplotene (Fan and Sun, 2003). Tyto oocyty jsou mnohonásobně objemnější než oogonie a obsahují více organel v cytoplazmě (Van den Hurk and Zhao, 2004).

Oocyty s vrstvou pre-granulózních buněk vstupují do prvního meiotického dělení ještě v období fetálního vývoje (Fair, 2003). Například u savců jsou pozorovatelné první oocyty ve fázi diplotene meiotické profáze I již v osmnáctý den embryogeneze. Chromozomy těchto oocytů mají viditelná chiasmata vzniklá při crossing-overu. Při narození se většina oocytů nachází v pozdním stadiu diplotene profáze I, nazývaném diktyotene. Pět dní po narození jsou v diktyotene již téměř všechny oocyty (Albertini and Wassarman, 1994). Tento stav označujeme jako první meiotický blok (Fan *et al.*, 2002) nebo také jako GV stadium (Fan and Sun, 2003) podle interfázního jádra, tzv. zárodečného váčku- GV (Germinal Vesicle) (Setiadi, 1998).

Inhibiční faktory, které udržují oocyt v klidové fázi, jsou syntetizovány přímo v něm, nebo v okolních folikulárních buňkách, odkud jsou do oocytu transportovány. Mezi hlavní inhibiční faktory se řadí hypoxantin z thékálních buněk, cyklický adenosin monofosfát

(cAMP) kontinuálně se uvolňující z kumulárních granulózních buněk, cyklický guanosin monofosfát (cGMP), reaktivní kyslíkové skupiny (ROS) a protein kinázy A a C (PKA a PKC). Zejména vysoká hladina cAMP a aktivita PKA jsou zásadní pro udržení oocyty ve stadiu diktyotene (Chaube *et al.*, 2010).

Oocyt a k němu přilehlé kumulární buňky tvoří kumulo-oocytární komplex (COC). Inhibiční faktory, živiny, signální molekuly a látky syntetizované v rámci COCs jsou mezi oocytem a kumulárními buňkami přenášeny přes spoje typu gap-junction. Utváření těchto komunikačních kanálů mezi povrchovou membránou oocyty a granulózními buňkami, které ji obklopují, probíhá u myšího embrya již od stadia primordiálních folikulů. Gap-junctions jsou tvořeny proteiny konexiny a hrají důležitou roli v růstu oocyty, jeho vývoji a meiotickém zrání (Fair, 2003).

Oocyty setrvávají v diktyotene po dobu svého růstu až do chvíle, kdy folikuly, v nichž jsou uzavřeny, podlehnou atrezii nebo se postupně stanou plně dorostlými, Graafovými folikuly (Fan *et al.*, 2002). První meiotický blok oocytů může trvat několik měsíců až let, v závislosti na druhu zvířete (Albertini and Wassarman, 1994).

Růst folikulu je realizován proliferací a diferenciací buněk granulózy. Probíhá aktivace primordiálního folikulu, kdy se kolem rostoucího oocyty utváří vrstva 11-20 granulózních buněk, které mění svůj tvar z plochého na kubický. Tehdy již bývá folikul označován jako primární (Adhikari and Liu, 2013). U krav tato transformace probíhá zhruba 140. den (Fair, 2003) a u prasat 75. až 90. den vývoje (Pepling, 2013). Primární folikuly zůstávají v klidovém stadiu, dokud není, pravděpodobně ovariálními vlivy, podnícen jejich růst- takzvaný initial recruitment (McGee and Hsueh, 2000). Na initial recruitment mají s vysokou pravděpodobností rozhodující vliv samotné oocyty. Mezi látky ovlivňující vývoj folikulu v tomto stadiu patří zejména oocytem produkovaný GDF-9 (Growth Differentiation Factor-9), který patří do rodiny TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta). (Eppig, 2001).

Růst oocyty v primárním folikulu probíhá zejména zvětšováním cytoplazmy (Romanovský *et al.*, 1988). Růst a kvalita oocytů jsou přímo spojeny s počtem somatických granulózních buněk k nim náležejících (Fair, 2003), bez nich by oocyty zanikly (Eppig, 2001). Během růstu, který se dá rozdělit na dvě části, prodělávají oocyty i folikuly řadu morfologických změn (Albertini and Wassarman, 1994). V první růstové fázi oocyt a k němu náležející kumulární buňky rostou koordinovaně. V druhé části se oocyt již nezvětšuje a jeho velikost zůstává konstantní, zatímco folikul roste do pre-ovulační velikosti. V tomto stadiu je folikul stimulován gonadotropinem FSH (Folicle Stimulating Hormone) a modulačními faktory z granulózních buněk a buněk *theca interna* s endokrinní aktivitou (Eppig, 2001).

U pohlavně dospělé myši dokončují oocyty růst před zformováním folikulárního antra. V důsledku toho, se většina folikulárního růstu odehraje až po ukončení růstu oocyty.

V prvním stadiu růstu získávají oocyty meiotickou kompetenci související s jejich velikostí a zároveň vykazují vysokou transkripční aktivitu. Pojmem meiotická kompetence se označuje schopnost oocyty zahájit meiotické zrání a plnohodnotně ho dokončit dosažením stadia metafáze II a současně vydělením prvního pólového tělíska. Získání úplné meiotické kompetence umožňuje oocytům uskutečnit GVBD (Germinal Vesicle Breakdown). Po GVBD následovně oocyty přestoupí do metafáze I, vydělí 1. pólové tělíska a dosáhnou metafáze II (Albertini and Wassarman, 1994). Malé nekompetentní oocyty toho nejsou schopny, tudíž nemohou podstoupit fázi zrání (Fan *et al.*, 2002).

Oocyty pokračují v růstu poté, co získají vývojovou kompetenci pro obnovu meiózy. Nicméně, oocyty schopné obnovit meiózu nemusí být nutně kompetentní k tomu, aby podstoupily kompletní jaderné zrání a vývoj do metafáze II. Meioticky kompetentní oocyty se nachází v antrálních folikulech a jestliže jsou z nich vyjmuty, jsou v *in vitro* podmínkách schopny spontánně obnovit meiózu, pokud je pro jejich kultivaci použito podpůrné medium (Eppig, 2001). Získávání meiotické kompetence je druhově specifické a úzce souvisí jak s velikostí folikulu, tak s konečnou velikostí oocyty (Fan *et al.*, 2002).

Na zvýšenou transkripční aktivitu oocyty poukazuje řada změn v jeho ultrastruktuře. V této fázi je rostoucí oocyt již uzavřen v sekundárním, neboli pre-antrálním folikulu (Gougeon, 2004), který již začíná být citlivý na gonadotropiny (Eppig, 2001). Chromatin oocyty má v počátečním stadiu růstu podobu difuzních bivalentů, zatímco na konci je kondenzovaný. Spolu s jádrem se zvětšuje i jádérko, což je provázáno intenzivní syntézou ribozomální RNA, která postupně ustává s dalším růstem. Cytoplazmatické změny se projevují přibýváním mitochondrií a změnou jejich struktury. Vznikají některé nové orgány, jimiž jsou například *zona pellucida* nebo kortikální granula. Obě tyto orgány se podílejí na dějích probíhajících v průběhu oplození a po něm. Kortikální granula se derivují z Golgiho komplexu a kumulují se před očekávanou ovulací a fertilizací. *Zona pellucida*, relativně silný extracelulární obal vyskytující se u všech savčích oocytů, se postupně ztlušťuje se zvětšujícím se průměrem oocyty. Na začátku růstu oocytů se glykoproteiny ZP1, ZP2 a ZP3 pro tvorbu *zóny pellucidy* vyskytují mezi oocytem a folikulárními buňkami ve formě shluků filament, která se postupně propojují. *Zona pellucida* obsahuje receptory pro spermie, před oplozením zprostředkovává jejich interakci s vajíčkem a zabraňuje polyspermii. U nerostoucích oocytů *zona pellucida* chybí. U prasat trvá růst primárních oocytů přibližně 80 dní a za tuto dobu dosáhnou konečné velikosti 120  $\mu\text{m}$  (Albertini and Wassarman, 1994).

Kvalita oocyty je přímo spojena s počtem kumulárních buněk, které jej obklopují. V *in vitro* podmínkách mají vyšší šanci na vývoj a dozrání oocyty, které měly před kultivací kompaktní kumululus (Liu *et al.*, 2004).

Přechod do terciálního, antrálního, folikulu je charakterizován pokračující proliferací a diferenciací buněk obklopujících oocyt na *theku internu* a *theku externu* (Fair, 2003). U terciálních folikulů se začínají tvořit malé dutinky, které se plní folikulární tekutinou, postupně se propojují a vytváří *antrum folliculi* (Gougeon, 2004). Mnoho folikulů v tomto stadiu zanikne (Pepling, 2013). Aby se antrální folikuly mohly dále vyvíjet a dozrát v pre-ovulační, dominantní folikuly, je nepostradatelná endokrinní stimulace gonadotropiny.

FSH je nepostradatelný pro již zmiňovaný inicial recruitment i cyclic recruitment (Chaube *et al.*, 2010). Po každém zvýšení hladiny FSH se objeví folikulární vlna, což je skupina rostoucích folikulů, které jsou citlivé na tento hormon (Adams *et al.*, 1992). Druhým gonadotropinem, působícím pre-ovulační vlnou na vyvíjející se folikuly, je LH (luteinizační hormon). LH se váže na receptory buněk *theka interna* (Xu *et al.*, 1995) a zprostředkovaně tak působí na oocyt, který sám gonadotropinové receptory nemá (Chaube *et al.*, 2010).

Folikuly označujeme jako dominantní ve fázi, kdy jejich velikost dosahuje 8-9 mm a růst je rychlejší než u folikulů ostatních. Další vývoj dominantních folikulů závisí na hladině LH. Jestliže se zvýší, růst folikulů pokračuje a oocyty začínají zrát. Pokud se úroveň LH sníží, folikuly zaniknou (Pepling, 2013).

#### **4.1.3 Fáze zrání**

Meiotické zrání oocytů představuje poslední stadium oogeneze, kdy oocyt získává oplozovací schopnost. Zrání je specifickým sledem změn, které se *in vivo* odehrávají v době mezi pre-ovulační vlnou LH a ovulací a jsou typické pro přeměnu plně dorostlých oocytů, přítomných v antrálních folikulech, na neoplozená vajíčka. Jako vajíčko označujeme plně dorostlý a dozrálý MII oocyt. Izolované, plně dorostlé oocyty podstupují v *in vitro* podmínkách meiotické zrání spontánně i bez přítomnosti hormonů (Albertini and Wassarman, 1994). Během doby zrání probíhají souběžně transformace v jádře i cytoplazmě oocyty (Eppig, 2001). Jen oocyty, které podstoupily zrání, jsou schopné oplození a dalšího embryonálního vývoje (Albertini and Wassarman, 1994).

Mezi změny, které oocyt podstupuje, patří zejména vývoj jádra z diktyotene stadia profáze I až do metafáze II, kdy probíhá první meiotická redukce a metabolické změny

nezbytné pro aktivaci oocyty během oplození. Tyto změny jsou souhrnně označovány jako meiotické zrání oocyty.

Pro přechod do fáze zrání je zapotřebí, aby se aktivovaly dva klíčové faktory meiotického zrání, MPF (Maturation Promoting Factor) a MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), které spolu kooperují i fungují paralelně (Chaube *et al.*, 2010). Tyto dvě kinázy se mohou aktivovat jen v plně dorostlých a meioticky kompetentních oocytech. Malé nekompetentní oocyty toho nejsou schopny, tudíž nemohou podstoupit fázi zrání (Fan *et al.*, 2002).

#### **4.1.3.1 Cytoplazmatické zrání**

Během zrání dochází v cytoplazmě k mnoha morfologickým změnám, které jsou biochemicky řízeny působením různých faktorů.

##### **4.1.3.1.1 Faktory ovlivňující zrání**

#### **MPF**

MPF je kináza se schopností fosforylovat aminokyselinové zbytky serinu a threoninu. MPF se skládá z katalytické a regulační podjednotky. Katalytickou podjednotku zde představuje na cyklinu dependentní protein-kináza CDC2 (Cyclin-Dependent Protein-Kinase) a druhou, regulační podjednotkou, je cyklin B. V rostoucích oocytech se MPF nachází v neaktivní fosforylované formě, pre-MPF. U meioticky kompetentních oocytů s dokončeným růstem je pre-MPF nakumulována v dostatečném množství, aby se mohla aktivovat na MPF (Fan *et al.*, 2002).

Na syntéze cyklinu B v G2 fázi a degradaci na konci metafáze je závislá kinázová aktivita MPF (Chaube *et al.*, 2010). Pro aktivaci MPF je nutné navázání cyklinu B na CDC2 kinázu (Fan *et al.*, 2002). Katalytická podjednotka MPF je do té doby neaktivní, protože je v místě tyrosinu (Tyr-15) a threoninu (Thr-14) fosforylována kinázami MYT1 a WEE. Aby mohla být tato inhibiční fosforylace odblokována, musí nad inhibičními kinázami převážít cyklin-dependentní fosfatáza CDC25 (Cyclin-Dependent Phosphatase 25). Současně s defosforylací Tyr-15 a Thr-14 musí dojít k fosforylaci threoninu 161. Kináza CDC2 je inaktivována proteolýzou cyklinu B pomocí proteozomu a ubiquitin ligázy (Irniger, 2006).

MPF začíná zvyšovat svoji kinázovou aktivitu během meiotického zrání oocyty, nejvyšší úroveň dosahuje ve stadiu metafáze I, v anafázi-telofázi meiózy I přechodně klesá

a poté v metafázi II opět dosahuje maximální hladiny (Albertini and Wassarman, 1994). MPF napomáhá udržet oocyt v druhém meiotickém bloku. Aktivita MPF je zvýšená až do chvíle, kdy je oocyt aktivován spermií.

MPF společně s MAPK indukuje rozpad zárodečného váčku (GVBD). Její katalytická podjednotka CDC2 řídí fosforylací a defosforylací příslušných proteinů kondenzaci chromozomů. MPF je zodpovědná za rozpad obalu jádra a při tvorbě dělicího vřeténka napomáhá reorganizaci mikrotubulů (Alberts *et al.*, 1998).

## **MAPK**

MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) patří do rodiny serin-threoninových kináz a zahrnuje kinázy, které se podílí na signalizačních drahách v buňkách. Kinázami spadajícími do této skupiny jsou ERK1- 4, p38, JNK a MAP kináza 1, přičemž JNK a p38 jsou označovány jako stresové kinázy.

Aktivace MAPK je kaskádovitá a spočívá v proteinkinázových fosforylacích na aminokyselinách threoninu a tyrosinu. MAPK je fosforylována jednou z kináz MAPKK (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase), jimiž jsou MOS nebo MEK. MOS je produkována protoonkogenem *c-mos* (Tunguist *et Maler*, 2003). Substrátem MAPK je ribozóm S6-kináza p90RSK, jejímž prostřednictvím se podílí na opětovné syntéze MPF ve fázi přechodu oocytu z meiozy I do meiozy II.

MAPK je aktivována buď v granulózních buňkách přilehlých k oocytu nebo v oocytu samotném (ERK1 a ERK2). Většinové množství ERK1 a ERK2 se po aktivaci MOS kinázou kumuluje v jádře. Důvodem pro aktivaci v granulózních buňkách je obnovení meiozy z prvního meiotického bloku. V druhém případě zajišťuje MAPK děje odehrávající se po uvolnění z diplotene bloku, jako například organizace meiotického vřeténka (Chaube *et al.*, 2010).

Načasování aktivity MAPK je narušeno od MPF u různých druhů zvířat odlišně (Fan and Sun, 2003). U myši je MAPK aktivována souběžně nebo krátce po GVBD, to znamená, že její přítomnost není pro aktivaci MPF a pro samotný GVBD nezbytná (Fan *et al.*, 2002), zatímco u prasat je přítomnost MAPK pro GVBD a zrání oocytu nepostradatelná (Whitaker, 1996). Dle výzkumů Fan and Sun (2003) roste aktivita MAPK s postupem meiozy I, kulminuje v metafázi I a zůstává vysoká u oocytů v druhém meiotickém bloku (metafáze II) a to u všech zkoumaných druhů, včetně prasete. Její úlohou je udržet chromozomy v kondenzovaném stavu, je nezbytná pro oddělení chromozomů a také pro potlačení S fáze mezi děleními. Podílí se i na udržení oocytu v druhém meiotickém bloku, v metafázi II



(Whitaker, 1996). MAPK fosforyluje jaderné laminy a zabraňuje tak udržení intaktní jaderné membrány (Inoue *et al.*, 1998).

### **cAMP/ PKA**

Pro obnovení meiózy z prvního meiotického bloku a zrání je nezbytné nejen získání meiotické kompetence a aktivace proteinových kináz MPF a MAPK, ale i pokles hladiny inhibičních faktorů, které tento blok udržují. Jedním z těchto faktorů je cAMP (Cyclic Adenosine Monophosphate) (Fan and Sun, 2003).

cAMP je vnitrobuněčný posel derivovaný z ATP (Adenosintriophosphate) enzymem adenylátcyklázou. Naopak jeho štěpení zajišťuje cAMP-fosfodiesteráza (cAMP-PDE) (Alberts *et al.*, 1998), kterou produkují samotné oocyty (Dekel *et al.*, 1988). V oocytech plní cAMP úlohu aktivátoru cAMP-dependentní proteinkinázy PKA, která fosforylací řídí další aktivitu enzymů. PKA je serin/treonin kináza, která je bez navázání na cAMP neaktivní. Substrátem PKA jsou fosfoproteiny, mezi nimi i WEE kináza inhibující činnost MPF. WEE je tak mechanismem, jímž cAMP/PAK komplex inhibičně působí na aktivitu MPF a zrání oocytů. PAK brání zrání oocytu také prostřednictvím inaktivace Cdc25, která je nezbytná pro aktivování pre-MPF.

Jestliže klesne hladina intracelulárního cAMP, dojde k inaktivaci PKA. Pokles hladiny cAMP v GV oocytech je předpokladem pro obnovení meiózy a aktivaci MAPK (Fan and Sun, 2003). Možností, jak k poklesu dochází, je několik. Například stimulace oocytu gonadotropiny způsobí přechodné zvýšení hladiny cAMP v dosud kompaktním kumulu, ten expanduje a hromadí se v něm kyselina hyaluronová. Tyto děje zapříčiní oddálení kumulárních buněk od oocytu. *Gap-junctions* spoje mezi nimi jsou přerušeny, čímž je znemožněn přenos cAMP z kumulu do oocytu a jeho hladina tak klesne. Další alternativou je snížení cAMP za pomoci cAMP-fosfodiesterázy (cAMP-PDE) přímo v oocytech (Kovo *et al.*, 2006).

### **CSF**

CSF (Cytostatic Factor) je komplex proteinů, který oocyt udržuje v metafázi II po ukončení zrání až do oplození. CSF je produktem *c-mos* proto-onkogenu 2. Cytoplazma ovulovaných oocytů obsahuje CSF, který prostřednictvím stabilizace syntézy cyklinu B udržuje hladinu MPF na konstantně vysoké úrovni během MII. CSF zabraňuje proteolytické degradaci cyklinu B polyubikvitinací. Po oplození je CSF inaktivován, hladina

MPF klesne a meiotické dělení je dokončeno (Masui and Markert, 1971). Prostřednictvím CSF je zabráněno partenogenetické aktivaci neoplozených vajíček (Kishimoto, 2003).

### **Ca<sup>2+</sup>/CaM/CaMKII**

Při partenogenetické aktivaci nebo během oplození *in vivo* se dočasně zvyšuje hladina vápníku v cytoplazmě, čímž je aktivován APC (Anaphase Promoting Complex). Dochází tak k ubiquitin-dependentní degradaci cyklinu B a k uvolnění vývoje oocyty z MII fáze. Klíčovým, na vápníku závislým mediátorem uvolnění CSF, je CaMKII (Calmodulin-Dependent Protein Kinase II). Vlivem CaMKII dochází k degradaci cyklinu a inaktivaci CDC2 kinázy, čímž je inaktivována i MPF (Masui and Markert, 1971).

#### **4.1.3.1.2 Morfologické aspekty cytoplazmatického zrání**

Během zrání dochází v důsledku biochemických procesů k řadě morfologických změn v cytoplazmě, které označujeme jako cytoplazmatické zrání. Cytoplazmatické zrání je běžně definováno jako děje, které probíhají na dozrávajícím oocyty a jsou nezbytné pro oplození a raný embryonální vývoj. Přestože většina těchto změn v cytoplazmě probíhá paralelně s jaderným zráním, některé stěžejní změny probíhají již během růstu oocytů, před obnovením meiózy. Průzkumy dokázaly, že zahájení cytoplazmatického zrání je závislé na zráním jaderném (Eppig *et al.*, 2004).

Mezi změny odehrávající se během cytoplazmatického zrání patří redistribuce buněčných organel, například endoplazmatického retikula (ER) a některých podjednotek Golgiho aparátu, přesun mitochondrií do perinukleární pozice při GVBD a v metafázi II a dále také shromáždění kortikálních granul v cytoplazmě u plazmatické membrány (Van den Hurk and Zhao, 2004). Pro normální průběh oplození je důležitý zejména poslední jmenovaný krok, kdy se kortikální granula po náhlém vzrůstu Ca<sup>2+</sup> přesunou do perivitelinního prostoru a způsobí na *zoně pellucidě* chemické i fyzikální změny, které zabraňují polyspermii. Hrubé ER po GVBD mizí a mitochondrie a lipidové kapky zůstávají nahloučeny (Guraya, 2008). Oocyty savců obklopují kumulární buňky, které se skrze *gap-junctions* spoje podílejí na řízení metabolismu oocyty, tedy i na jeho zráním. Pokud je oocyt kumulárně zbaven, může podstoupit zráním, ale další vývoj *in vitro* po oplození je méně kvalitní, než u oocytů *in vivo*. Příčinou tohoto zhoršení je pravděpodobně nedostatečná kvalita cytoplazmy (Tatemoto *et al.*, 2000).

Pro kultivaci prasečích oocytů *in vitro* má význam i velikost folikulu, z nějž jsou aspirovány. Oocyty získané ze středně velkých folikulů mají oproti oocytům z malých folikulů zralejší cytoplazmu, a proto potřebují pro zrání kratší dobu (Setialdi, 1998).

#### **4.1.3.2 Jaderné zrání**

Principem jaderného zrání je redukce počtu chromozomů z diploidního (2n) na haploidní (n) (Eppig et al, 2004). Mezi změny, které se odehrávají ve zrajícím oocytu, patří zejména GVBD, kondenzace chromozomů, vznik dělicího vřeténka, oddělení homologních chromozomů v anafázi I a vydělení 1. pólového tělíska s jednou sadou chromozomů v telofázi I. Posledním zmiňovaným krokem oocyt uzavře meiózu I. V tuto dobu klesá aktivita MPF, zatímco MAPK zůstává na stejné úrovni, aby zabránila replikaci DNA (Chaube *et al.*, 2010). Po interkinezi vstoupí oocyt do meiózy II a zastaví se ve stadiu metafáze II (2. meiotický blok) (Cooper, 2000). Ve stadiu metafáze II je oocyt u většiny savců ovulován a zůstává v něm až do oplození (Eppig et al, 2004). Neoplozená vajíčka jsou u většiny obratlovců zastavena v metafázi II za pomoci cytostatického faktoru (CSF), který u zralých oocytů zastavuje přechod do anafáze II (Chaube *et al.*, 2010). V porovnání s ostatními savci tvoří výjimku psi, lišky a vlci, jejichž oocyty jsou ovulovány již v GV stadiu (Eppig et al, 2004).

Typickým počátečním rysem jaderného zrání je rozpad zárodečného váčku, GVBD, který je spojen s kondenzací chromatinu a následným rozpadem jaderné membrány. U krav se GVBD se objevuje zhruba 24 hodin po píku LH . (Eppig, 2001). Chromatin GV oocytu byl u modelu prasat rozdělen před GVBD do čtyř tříd. Kritérii pro rozdělení jsou viditelnost jadérka a jaderných membrán, uspořádání, kondenzace a změny na chromatinu. Jadérko a jaderná membrána GV1 třídy oocytů jsou intaktní a kondenzovaný chromatin utváří prsteneček heterochromatinu kolem jadérka. GV2 třída je podobná GV1 - jádro je stále viditelné. V GV3 je chromatin rozptýlen a nukleoplazma je méně granulózní. U oocytů z GV4 třídy je pozorovatelný chromatin kondenzovaný do samostatných bivalentů, jejich jaderná membrána není viditelná a jadérko zaniklo úplně. U myši se GV chromatin dělí obdobně do pěti tříd, kde je oproti prasatům navíc GV0 třída (Fan and Sun, 2003). GVBD u nezralých oocytů nastává krátce po aktivaci MPF (Albertini and Wassarman, 1996).

Jak již bylo popsáno výše, po GVBD oocyt přechází přes metafázi I do anafáze I a dále do telofáze I, kdy se vydělí první pólové tělísko se sadou chromozomů. Pro tento děj je typická asymetrie - pólové tělísko je výrazně menší, než oocyt (Eppig, 2004).

Jakmile oocyt vstoupí do meiózy II, aktivita MPF, dosud snížená, znovu vzroste a dosahuje nejvyšší hladiny v metafázi II. Právě MPF je kináza zodpovědná za udržení druhého meiotického bloku ve stadiu metafáze II. Aktivitu MPF na vysoké úrovni udržuje cyklin B, syntetizovaný v dostatečném množství, a CSF (Setiadi, 1998).

## 4.2 Buněčný stres v průběhu meiotického zrání oocytů

Během metabolických procesů, odehrávajících se v oocytu a v buňkách k němu přilehlých, vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS- reactive oxygen species). Nejčastějšími reaktivními formami kyslíku jsou především superoxidové aniony, hydrogen peroxid a hydroxylové radikály (Agarwal *et al.*, 2005).

Výskyt ROS je fyziologický a *in vivo* je nezbytný například pro správné fungování somatických buněk. Podílí se především na proliferaci a diferenciaci buněk a na redukčně oxidačních reakcích, které jsou součástí jejich signálních drah (Poli *et al.*, 2004). ROS mají vliv také na úspěšný vývoj a zrání oocytů, potažmo jejich kvalitu. Ačkoliv se experimenty zaměřené na výzkum vlivu ROS na průběh GVBD oocytů rozcházejí ve výsledcích, je jasné, že ROS mají dopad i na tento proces. Jiné studie dokonce potvrzují pozitivní korelaci mezi zvýšenou hladinou ROS ve folikulární tekutině a úspěšností otěhotnění u žen (Attaran *et al.*, 2000). Stejně jako nedostatek, způsobuje i přemíra ROS v buňce patologické jevy. Jestliže je ROS příliš, poškozují DNA, mitochondrie, proteiny a negativně působí i na sacharidy.

Hladina ROS je v organismu vyrovnávána pomocí antioxidantů, kterými jsou zejména kataláza, glutathion peroxidáza, superoxid dismutáza (SOD) a redukovaná forma glutathionu (GHS). Na snížení úrovně ROS se podílí i neenzymatické antioxidanty jako jsou vitamín A, C a E, pyruvát, glutathion a taurin (Brigelius and Flohe, 1999). Při optimálních podmínkách je poměr mezi ROS a antioxidanty vyrovnán. Tento poměr je určován oxidovaným, versus redukovaným glutathionem. Jestliže je rovnováha mezi těmito dvěma ukazateli narušena a produkce volných radikálů a antioxidační aktivita tkání je v disbalanci, nastává v buňce oxidativní stres (OS) (Luberda, 2005).

Oxidativní stres způsobený zvýšenou hladinou ROS je jedním z problémů, se kterými se embryologické laboratoře při kultivaci oocytů potýkají a který je zásadní pro úspěšné IVF. *In vivo* se oocyty nachází ve folikulární tekutině, kde se kromě ROS přirozeně vyskytují také antioxidanty. Celková antioxidační kapacita folikulární tekutiny je důležitým ukazatelem

úspěšně provedeného IVF (Pasqualotto *et al.*, 2004). Při kultivaci *in vitro* je však prostředí, v němž se oocyty nachází, rozdílné. Kultivační medium nemá vyvážený poměr mezi vznikajícími ROS a antioxidantními pochody, což je způsobeno působením světla, mechanickou manipulací s oocyty a v neposlední řadě i adicí různých látek do kultivačního media (Attaran *et al.*, 2000). V současné době se vyrábí kultivační media s přidávkem folikulární tekutiny, do budoucna se uvažuje o užívání medií založených na přirozených antioxidantních vlastnostech folikulární tekutiny (Sabatini *et al.*, 1999). Nicméně, aplikování exaktních fyziologických dávek antioxidantů do *in vitro* prostředí ve snaze imitovat přirozené prostředí oocyty by bylo poněkud zjednodušené řešení. Intrafolikulární prostředí se individuálně liší a v potaz se musí brát mimo jiné také metabolická a sekreční aktivita granulózních buněk folikulu.

*In vivo* je velké množství volných radikálů, vzniklých během buněčného cyklu, zachyceno vestavěným obranným mechanismem samotného folikulu (Kodaman and Behrman, 2001). Tanghe *et al.* (2003) uskutečnili výzkum, z něhož vyplynulo, že u oocytů s vrstvou kumulárních buněk (COCs) je koncentrace ROS v mediu vyšší, než u oocytů kumulárních buněk zbavených (DOCs), což, jak se v experimentu prokázalo, podporuje penetraci oocyty spermii. Dalším poznatkem, který vyplynul z tohoto výzkumu, byl fakt, že kumulární buňky hrají důležitou roli v ochraně porcinních oocytů před apoptózou vyvolanou oxidativním stresem. Důkazem toho je, že v porovnání s COCs, které vykazovaly minimální změny, byla jaderná DNA DOCs oxidativním stresem více poničena a ve vyšší míře se vyskytovaly i apoptotické změny. Menší schopnost DOCs vyrovnávat se s oxidativním stresem souvisí s nižší hladinou glutathion peroxidázy, kterou oproti COCs disponují. Kumulární buňky obsahují množství antioxidantů, které se během zrání zmenšuje. Kultivace DOCs v přítomnosti kumulárních buněk plnohodnotně nenahradí propojení oocyty a kumulu *gap- junctions* spoji, jak je tomu u COCs. Nestačí tedy jednoduše přidat kumulární buňky ke kultivovaným DOCs, protože právě propojení kumulárních buněk s oocytem je to, z čeho oocyty profitují. (Luciano *et al.* 2005).

V *in vitro* podmínkách se v důsledku výše zmíněných faktorů nejčastěji setkáváme se zvýšenou hladinou ROS, což ústí v oxidativní stres (Esfandiary *et al.*, 2005). Oxidativní stres v oocyty ovlivňuje řadu pochodů během meiotického zrání. Může narušit integritu dělicího vřeténka (Choi *et al.*, 2007) a má vliv také na redox potenciál a mitochondriální aktivitu buněk, což ovlivňuje celistvost cytoskeletu (Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2004). Oxidativní stres se podílí na vzniku aneuploidie, zvláště v MI fázi (Hassold et Hunt, 2001) a indukuje řadu degenerativních změn, například apoptózu (Ambruosi *et al.*, 2011).

Redukčně-oxidační status buňky, vzchází s přemírou ROS a poklesu antioxidantů je jedním z faktorů podněcujících apoptózu (Otto *et al.* 2007). *In vitro* studie prokázaly, že oxidativní stres indukuje apoptózu v závislosti na aplikovaném množství a na čase působení (Zhang *et al.*, 2006b).

### 4.3 Apoptóza

Apoptóza je fyziologická, geneticky programovaná smrt buněk vyskytující se u všech živých organismů. Apoptóza sestává z molekulárních dějů, jejichž konečným důsledkem je zánik buňky. V jejím průběhu však na rozdíl od nekrózy nedochází k vylití cytoplazmy do buněčných mezíprostor, protože buněčná membrána není narušena a apoptotická tělíska jsou fagocytována makrofágy (Alberts *et al.*, 1998). Okolní buňky tak nejsou poškozovány a nedochází k zánětu (Koopman *et al.*, 1994).

#### Uplatnění apoptózy

Mechanismus apoptózy je využíván v prenatalním vývoji a dále i po celý život jedince. Uplatňuje se během diferenciací tkání a orgánů v průběhu embryogeneze, kdy tímto způsobem vznikají končetiny a prsty na nich (Alberts *et al.*, 1998), v postnatálním období u samic umožňuje atrézii folikulů a luteolýzu (Abud, 2004). Apoptóza zabraňuje množení poškozených buněk při tkáňové obnově v pohlavním a trávicím traktu a při hematopoéze a udržuje počet buněk konstantní, neboť nadpočetné, infikované nebo vadné buňky jsou odstraněny (Andreu-Vieyra et Habibi, 2000). Je pravděpodobné, že takto jsou odstraňovány i oocyty, v jejichž vývoji se vyskytly abnormality (Guthrie and Garrett, 2000). V neposlední řadě je apoptóza také součástí imunitního systému (Koopman *et al.*, 1994). Přestože je programovaná smrt buněk přirozená, může ji spouštět mnoho faktorů endogenního a exogenního původu, mezi něž můžeme zahrnout například již výše zmiňovaný oxidativní stres, dále různé protilátky, hormonální nerovnováhu a deprivaci růstových faktorů (Morita and Tilly, 1999).

#### Charakteristické znaky apoptózy

Pro apoptózu jsou charakteristické určité dílčí děje následující po sobě v jasně stanovené posloupnosti. V první fázi dochází k utváření apoptotických tělísek, která jsou v druhé fázi fagocytována. Změny způsobené apoptózou jsou pozorovatelné v elektronovém

mikroskopu. (Kerr *et al.*, 1972). Apoptotická tělíska vznikají postupnou fragmentací buňky. Ta nejprve zdatelně zmenšuje svůj objem, její membrána se zvlní v důsledku dehydratace a na povrchu se objeví puchýřky. Jaderný chromatin buňky kondenzuje a DNA se rozpadá (Saran, 2000). Dále dochází v průběhu buněčné smrti také k metabolickým změnám, kdy je mobilizován intracelulární  $Ca^{2+}$  a interagují mezi sebou cytoplazmatické proteiny a aktivovaná transglutamináza. Takto dochází k rozrušení buněčného cytoskeletu, což vede k asymetrii cytoplazmatické membrány (Akkoyunlu *et al.*, 2007).

### **Regulace apoptózy**

Řízení apoptózy je regulováno na několika úrovních. První úrovní je genetická regulace, kdy jsou exprimovány různé geny kódující cytoplazmatické a membránové bílkoviny (Zakeri *et al.*, 1995). Druhým způsobem regulace je hormonální cesta. Za antiapoptotické faktory inhibující atrezii folikulů jsou považovány estrogény, gonadotropiny, TGF $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ) a EGF (epidermal growth factor). Jestliže jsou oocyty *in vitro* kultivovány s přidavkem kombinace některých těchto faktorů, je antiapoptotický efekt zesílen (Guthrie et Garrett, 2000).

### **Průběh apoptózy**

Fáze, kdy je apoptóza zahájena, se nazývá iniciační a její zahájení je možné díky vnitřní a vnější signální dráze, jejichž spouštěčem mohou být již zmiňované endogenní a exogenní faktory. Na buněčné membráně jsou umístěny receptory buněčné smrti, které reagují na podněty zvenčí a spouští tak apoptózu (Nagata, 1997). Jestliže jsou signální dráhy spuštěny, nastává druhá fáze, nevratná, kdy se aktivují proteolytické enzymy. Tato část je označována jako efektorová fáze apoptózy (Scaffidy, 1998). U savčích buněk jsou s průběhem apoptózy spojeny skupiny proteinů, jejichž ligandy se vždy vážou na pro ně specifický receptor buněčné smrti. Těmito skupinami jsou proteiny Bcl-2, TNF s důležitou funkcí při spouštění atrezie folikulů a také adaptorové proteiny (Nakayama *et al.*, 2002). Aktivace receptorů buněčné smrti vede zprostředkovaně k mobilizaci kaspáz a proapoptotických faktorů (Matsuda-Minehata *et al.*, 2006).

### **Vnější signální dráha**

Receptory podněcující buněčnou smrt spadají do rodiny TNF (Tumor Necrosis Factor). Do této skupiny patří TNF- receptory, TRAIL receptory (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) a také APO-1 receptory (Apoptosis antigen 1), též známé jako Fas

receptory. TNF receptory v sobě obsahují doménu DD, takzvanou doménu smrti (Death Domaine). Pro Fas je to například FADD (Fas-Associated Protein with Death Domain) (Huang *et al.*, 1996). Jestliže jsou receptory aktivovány navázáním ligandů, dochází k aktivaci specifických cytoplazmatických proteinů, které interagují s adaptorovými proteiny. Kooperací těchto dvou proteinových skupin dochází k aktivování prokaspáz jejich dimerací (Scaffidy, 1998). Tyto kaspázy vylitím do cytoplazmy přivádí k činnosti samotné efektorové kaspázy, včetně kaspáz 3, 6 a 7, které proteolýzou degradují proteinové substráty, například proteiny zodpovědné za udržení integrity genomu, a spoluzajišťují tak zánik buněk apoptózou (Jin and Deiry, 2005).

Apoptóza může být inhibována prostřednictvím regulace kaspázové aktivity za pomoci proteinů IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) s antiapoptotickým účinkem, které se váží na kaspázy 3, 7 a 9 (Huang *et al.*, 1996). Hlavním inhibitorem vzcházejícím z této proteinové rodiny je XIAP (X – linked Inhibitor of Apoptosis Protein) (Eckelman *et al.*, 2006). Efektorové a iniciační kaspázy se inhibují rozdílným způsobem, například u efektorových kaspáz 3 a 7 je toto zajištěno mimo jiné c-IAP1, c-IAP2 (Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 and 2) a NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein) proteiny (Roy *et al.*, 1997).

### **Vnitřní signální dráha**

Spuštění vnitřní signální dráhy může být reakcí na podněty z vnějšku buňky, kterými bývají oxidativní stres, radiace, deprivace růstových faktorů či přítomnost toxických látek (Matsuda-Minehata *et al.*, 2006). Všechny tyto faktory působí na centrum regulace vnitřní signální dráhy, mitochondrie v buňce a zejména na jejich membrány, u nichž mění propustnost. Permeabilita mitochondriální membrány je v důsledku působení těchto faktorů zvýšená, neboť se mění membránový potenciál a otevírají se membránové póry (Parrino *et al.*, 2007). Otevřenými póry proudí  $Ca^{2+}$ . Stresovými podněty je také vyvolána reakce cytoplazmatických proteinů Bax a Bak, které se přesouvají do mitochondrií a mění svoji konformaci. Existuje předpoklad, že inhibičním působením Bax na antiapoptotické faktory se z mitochondrií, konkrétně z jejich mezimembránového prostoru, uvolňují molekuly s proapoptotickou povahou, zejména cytochrom C (Gross *et al.*, 1999). Uvolnění cytochromu C z mitochondriální matrix je pasivní proces probíhající díky deaktivaci nebo odstranění antiapoptotických molekul, čímž je porušena integrita vnější mitochondriální membrány (Guthrie and Garrett, 2000). Řízení uvolňování cytochromu C a dalších molekul s proapoptotickou povahou, jako je například protein AIF (Apoptosis Inducing Factor)



a endonukleázy, spadá do kompetence proapoptotických faktorů patřících do rodiny proteinů Bcl-2 (B cell lymphoma-2) (Hussein, 2005). Cytochrom C se váže s APAF-1 (Apoptotic protease activating factor 1) a utváří tak komplex zvaný apoptozóm, který aktivuje iniciační kaspázu 9. Ta následovně spolu s APAF-1 aktivuje efektorové kaspázy 3, 6 a 7, které, jak již bylo výše zmíněno, degradují proteolýzou proteinové substrát

### **4.3.1 Bcl-2 proteiny**

Bcl-2 je skupina proteinů pro-apoptické nebo anti-apoptické povahy. Všechny tyto proteiny mají společnou minimálně jednu Bcl-2 doménu za škály BH1- BH4 (Kroemer, 1997). Bcl-2 skupina má stěžejní roli během regulace procesu apoptózy, protože působí na permeabilitu vnější mitochondriální membrány, čímž, v závislosti na své povaze, umožňuje nebo brání uvolnění mediátorů apoptózy (cytochrom C, AIF, endonukleázy) do cytoplazmy (Youle and Strasser, 2008). Proteiny z této rodiny se nachází zejména v mezimembránovém prostoru mitochondrií, v endoplazmatickém retikulu a v jádře (Hockenbery *et al.*, 1990). Do Bcl-2 rodiny proteinů patří přibližně 24 členů spadajících podle přítomnosti určité BH domény do jedné ze tří skupin. Jsou zde přítomny jak proapoptické, tak i antiapoptické proteiny a pro správnou regulaci apoptózy je nezbytné, aby tyto faktory byly v rovnováze (Youle and Strasser, 2008).

#### **4.3.1.1 Pro-apoptické proteiny**

Do první skupiny patří proteiny Bid a Bad, které jsou díky své molekulové konformaci známé jako *BH3- only*. Protože mají jen doménu BH3, nemohou působit samostatně (Guthrie and Garrett, 2000). *BH3- only* proteiny slouží jako ligandy pro ostatní ze dvou podskupin Bcl-2 proteinů (Kelekar *et* Thompson, 1998). Bid se váže hlavně s proapoptickými proteiny Bax a Bak, čímž se vzájemně aktivují a společně aktivují zvýšenou permeabilizaci vnější membrány mitochondrií. Oproti tomu protein Bad se napojuje na antiapoptické faktory, zejména na Bcl-2 protein, a znemožňuje jejich fungování (Youle and Strasser, 2008).

Druhou skupinou s proapoptickou povahou jsou proteiny Bax, Bak a Bok, které ovlivňují kaspázovou kaskádu a to tak, že ji aktivují. U těchto tří proteinů jsou přítomny domény BH1, BH2, BH3 a doména BH4 chybí. Z této skupiny se nejvíce exprimují proteiny Bax a Bak, které se účastní apoptotického procesu téměř ve všech tkáních (Kelly and Strasser, 2011).

Bax protein se nachází nejvíce v cytoplazmě, odkud se po indukci apoptózy translokuje do vnější membrány mitochondrie a mění svoji konformaci. Minimální množství Bax se v membráně nachází, aniž by byla apoptóza indukována (Kirkin *et al.*, 2004). V membráně Bax dimerizuje různými způsoby. Buď homodimerizací, kdy se pojí sám se sebou a vytváří oligomer Bax/ Bax, který podporuje apoptózu, anebo heterodimerizací, kdy se pojí s proteiny antiapoptotickými (Guthrie and Garrett, 2000). Bax protein je klíčovým faktorem apoptózy probíhající v ovariální tkáni. Zde indukuje buněčnou smrt oocytů, u nichž byly meiotickými kontrolními body zaznamenány odchylky v rekombinaci DNA při crossing-overu. Důkazem toho je zvýšené množství Bax proteinu ve fázi přechodu z pachytene do diplotene při kultivaci oocytů *in vitro* (Felici *et al.*, 1999). Bax rovněž ovlivňuje konečný počet ovulovaných vajíček u samic, protože v embryonálním vývoji i během života podněcuje apoptózu ve folikulárních buňkách. Jestliže je tato funkce narušena, rozvíjí se výskyt patologických folikulů s oocyty neschopnými oplození (Tilly, 1996).

#### **4.3.1.2 Anti-apoptotické proteiny**

Poslední podskupinou náležící do rodiny Bcl-2 proteinů jsou antiapoptotické proteiny. Patří sem samotný Bcl-2 protein a proteiny jemu strukturně podobné. Všechny mají domény BH1- BH4 a navíc doménu sloužící k integraci do membrán, takzvanou transmembránovou doménu (Adams and Cory, 1998). Stěžejní doménou těchto proteinů je BH4 doména podmiňující jejich povahu. Důvodem jejího antiapoptotického účinku je interakce s APAF-1, která zabraňuje spuštění kaspázové kaskády. Pokud je BH4 narušena, Bcl-2 proteiny ztrácí svou funkci. Jestliže se Bcl-2 proteiny v buňce nachází ve zvýšené míře, vytváří homodimery a brání tak apoptóze (Jin and El-Deiry, 2005).

Tyto proteiny mají více funkcí. Spolupracují s ostatními proteiny a s molekulami z prostředí vně mitochondriálních membrán. Heterodimerací s proapoptotickými faktory brání Bcl-2 proteiny dimeraci proapoptotických proteinů ve vnější membráně mitochondrií. Bcl-2 vyvazuje některé pro-apoptotické proteiny, čímž brání jejich oligomerizaci a inserci do vnější mitochondriální membrány (Danial, 2007). Například působení Bax je možné inhibovat Bcl-2 proteinem. Bcl-2 proteinem. Bcl-2 proteiny mohou vytvářet s Bax antiapoptotické heterodimery (Petros *et al.*, 2004). Membránové kanály tak zůstanou zavřené, cytochrom C se do cytoplazmy neuvolní a apoptóza není nastartována. Kooperace s proapoptotickými proteiny však může mít i opačný účinek v případě, že je účinek antiapoptotických proteinů neutralizován (Bouilett *et al.*, 1999).

Poměr Bcl-2 a Bax, někdy označovaný jako tzv. Bcl-2/Bax reostat, je kontrolním bodem, po jehož překročení je proces apoptózy ireverzibilní (Danial and Korsmeyer, 2004). Základní stav buňky vychází z rovnováhy anti-apoptotických a pro-apoptotických faktorů. Pokud dojde k aktivaci stresové JNK kinázy z řad MAP kináz, jsou indukovány pro-apoptotické faktory, včetně Bax. Naopak, jestliže se aktivují růstové faktory, indukují se anti-apoptotické faktory, včetně Bcl-2 a buňka přežívá (Clarke and Tyler, 2009).

### 4.3.2 Kaspázy

Kaspázy se podle délky a sekvence své N-terminální prodomény dělí na dvě skupiny. Do skupiny s dlouhou prodoménou patří kaspázy 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 14, krátkou prodoménou se vyznačují kaspázy 3, 6, 7, 11, 13 (Mancini *et al.*, 1998). Kaspázy 3, 7, 8, 9 se nachází v cytosolu buňky a když se aktivují, transportují se do endoplazmatického retikula a do jádra buňky. Kaspázy u buněk zprostředkovaně, aktivací, či deaktivací proteinů, spouští apoptózu. V buňce jsou lokalizovány jako inaktivní proenzymy a k činnosti jsou dovedeny proteolytickým štěpením. Každá z kaspáz má svou specifickou funkci. Kaspázy 8 a 9 jsou například spouštěči apoptózy, kaspáza 9 navíc umožňuje uvolňování cytochromu C. Efektorová kaspáza 3 je substrátem pro předchozí dvě a její přítomnost je důležitou podmínkou pro dokončení apoptózy například nervových zárodečných buněk, či buněk kmenových (Guthrie and Garrett, 2000).

## 4.4 Účinky sirných sloučenin česneku v organismu

Ačkoliv jsou v buňce přirozeně přítomny antioxidanty vyvažující účinky a působení volných radikálů, nemusí být jejich množství vždy pro buňku dostatečné a v důsledku toho svou činností nedokáží vyrovnat nadprodukcí ROS (Corso *et al.*, 2007). Tato disbalance vede k OS u buněk a následné apoptóze. Příjem antioxidantů z vnějšího prostředí může pomoci tomuto předejít. Zdrojem endogenních antioxidantů jsou mnohé rostliny, mezi nimi i česnek.

Pozitivní vliv česneku na zdraví je znám již od starověku a je využíván dodnes. Svým působením podporuje imunitní systém, má mimo jiné hepatoprotektivní, antiparazitární a antibakteriální účinky a eliminuje OS v buňkách (Iciek *et al.*, 2009). Co stojí za protektivními účinky česneku, není zcela jasné, neboť sloučeniny v něm obsažené fungují synergisticky. Pozitivní vliv česnekových složek na tkáň je podmíněn okolnostmi. Například pokud působí oxidativně na nádorové buňky, ničí je, což je žádoucí, avšak pokud

by oxidativně působily na buňky zdravé, destruktivní dopad by byl nežádoucí (Amagase *et al.*, 2006).

#### 4.4.1 Biosyntéza a metabolismus biologicky aktivních látek česneku

Za mnohými z těchto pozitivních účinků stojí sirné sloučeniny. V neporušených palicích česneku se nachází  $\gamma$ -glutamyl cystein, který se přeměňuje na alliin, sirnou aminokyselinu bez zápachu, od níž jsou ostatní sirné sloučeniny ve většině případů odvozené (Stoll *et Seebeck*, 1948). Alliin je prekurzorem allicinu a je hlavní složkou obsaženou v intaktních palicích česneku. Drcením či krájením česneku se z vakuol uvolňuje enzym allináza, která během několika sekund přemění většinu alliinu na allicin. Alliin je transformován na kyselinu sulfonovou, amoniak a pyruvát, přičemž poslední dva zmiňované jsou vedlejšími produkty této reakce (Lanzotti, 2006)

Činnost allinázy je nejefektivnější při pH 6,5. Pokud pH klesne pod 3,5, což jsou podmínky typické pro žaludek, je fungování enzymu allinázy zastaveno. Allináza je inhibována rovněž teplotou od 60 °C výše, proto tepelně zpracovaný česnek obsahuje zejména alliin. Kondenzací dvou molekul kyseliny sulfonové, vzniklé z alliinu, vzniká za současného působení allinázy allicin (Amagase *et al.*, 2006).

Allicin je těžko rozpustný ve vodě a dává česneku jeho charakteristickou vůni a chuť. Allicin je velmi nestálá látka, nebyl nalezen v krvi jen několik minut po vpravení do krevního oběhu, ani v moči lidí, kteří česnek pravidelně konzumují. To je způsobené tím, že se váže na proteiny a mastné kyseliny v plazmatické membráně, a proto je vychytán dříve, než vstoupí do krevního oběhu. Allicin pravděpodobně sám o sobě nepřispívá k žádnému z pozitivních účinků česneku v organismu, je meziproduktem, který je rychle přeměněn na další, již biologicky aktivní, sirné sloučeniny. Těmito látkami jsou polysulfidy, zejména diallyldisulfid (DADS) a diallyltrisulfid (DATS), které jsou obsažené v čerstvém česnekovém extraktu a v česnekovém oleji. Další biologicky aktivní látkou vzniklou z allicinu je v tucích rozpustný diallylmonosulfid (DAS) (Freeman and Koder, 1995).

Obsah sirných sloučenin v česnekovém oleji závisí na podmínkách, za jakých byl extrahován. Klíčovými faktory jsou především čas a teplota extrakce. Analýza extraktu, jenž byl ponechán 20 hodin při pokojové teplotě, ukazuje, že poměr v tucích rozpustných sloučenin vzniklých z allicinu je následující: DADS > DATS > DAS. V česnekovém oleji je obsaženo přibližně 20 různých sulfidů (Brodnitz *et al.*, 1971).

Další možností zpracování česneku je jeho extrakce v ethanolu při pokojové teplotě, kdy obsah alkoholu je 15-20 % a doba macerace 20 měsíců. Tímto způsobem vzniká takzvaný vyzrálý česnekový extrakt, AGE (aged garlic extract). AGE je látka bez zápachu, která po dlouhodobé maceraci obsahuje sírné sloučeniny, které jsou již stabilní. Hlavní složkou AGE je sírná aminokyselina SAC (S-allyl cystein) s vysokým antioxidantním potenciálem, druhou nejvíce zastoupenou složkou je SAMC (S-allylmercaptocysteine). Obě látky zastoupené v AGE mají vyšší a trvalejší pozitivní účinek na zdraví příjemce, než sloučeniny v syrovém česneku (Corzo-Martinez *et al.*, 2007). SAC byl po požití AGE prokázán v krvi v množství závislém na požití dávce AGE. SAC má antioxidantní a hepatoprotektivní účinky a chrání buňky před volnými radikály a rakovinou (Nakagawa *et al.*, 1988).

Pro správnou aplikaci sírných sloučenin česneku v medicínském odvětví je potřeba detailně znát principy jejich fyziologického účinku v organismu. Stejně tak i pro úspěšnou kultivaci *in vitro* je potřeba rozumět mechanismům působení sírných sloučenin česneku.

#### **4.4.2 Antioxidativní aktivita sírných sloučenin česneku**

Sírné sloučeniny česneku vykazují prokazatelně antioxidantní aktivitu. Její pozitivní vliv na buňky byl znatelně zvýšený v případech, kdy byl česnek konzumován pravidelně. Účinek sírných sloučenin byl ovlivněn také konkrétní úpravou česneku.

Sušený česnekový prášek a česnek tepelně upravený obsahují ve velké míře alliin. Ten vychytává volné radikály, ochraňuje lipidy před oxidací a zvyšuje aktivitu antioxidantních enzymů (Banerjee *et al.*, 2003). Alliin obsažený v česnekovém prášku navíc chrání buňky před chemickou cytotoxicitou (Ciplea *et Richter*, 1998).

Allicin, hlavní složka čerstvého extraktu česneku, v závislosti na podané dávce podporuje aktivitu endogenních antioxidantů a vychytává volné radikály. Stejně jako alliin brání peroxidaci lipidů a potlačuje oxidaci LDL, která je, spolu s ukládáním lipidů v cévách, hlavní příčinou aterosklerózy. Čerstvý česnekový extrakt tak zprostředkovaně chrání mozkové a srdeční buňky před oxidativním stresem indukovanou ischemií (Banerjee *et al.*, 2003). Allicin sehrává důležitou roli také při kultivacích *in vitro*, kdy jeho reakcí s aminokyselinami glutathionem a cysteinem vznikají antioxidantně aktivní produkty (Rabinkov *et al.*, 2000). Allicin samotný i jeho deriváty ovlivňují fungování proteinů S-thiolací, antioxidantním mechanismem buňky. (Pinto *et al.*, 2006).

Polysulfidy obsažené v česnekovém oleji mají protektivní vliv na kardiomyocyty. Brání je před oxidativním stresem způsobeným cholesterolem a následnou apoptózou. Polysulfidy také tvoří sirovodík, který rovněž působí jako antioxidant a také chrání buňky před OS (Ciplea and Richter, 1998).

Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazuje S-allyl cystein obsažený v AGE. AGE brání peroxidaci lipidů v endotelu plic, kde navyšuje aktivitu superoxid dismutázy a glutathion peroxidázy. Účinkem AGE je také zvyšována nitrobuněčná hladina glutathionu a glutathion disulfid reduktázy (Yamasaki *et al.*, 1994).

*In vitro* pokusy poukazují na fakt, že za příznivé účinky česneku je zodpovědný především S-allyl cystein. Důkazem toho byl pokus, kdy byly kardiomyocyty kultivovány s přidavkem extraktu z dřeně a slupky česneku. Ve slupce se však nenachází alliin, ani allicin, přítomen byl pouze S-allyl cystein a oxidativní stres byl přesto snížen a bylo tak zabráněno hypertrofii a apoptóze. Je proto pravděpodobné, že za protektivní účinky je zodpovědný SAC. Se stejným výsledkem jako u předchozího experimentu byl proveden i pokus, při kterém byla nervová tkáň poškozená ischemií ošetřena výtažkem z česnekové slupky. Česnek napomáhal přežitelnosti neuronů, napomáhal fungování mitochondrií u zasažených buněk a bránil změně potenciálu na mitochondriální membráně. Česnekové sloučeniny v organismu brání změně membránového potenciálu mitochondriální membrány a chrání ji tak před oxidativním stresem způsobeným nadměrnou produkcí ROS (Cervantes *et al.*, 2013).

Stejně jako u ostatních tkání těla, tak i v reprodukční soustavě má česnek protektivní úlohu. Za pomoci česnekových sloučenin je ve varletní tkáni snižován OS. DNA spermií je tak chráněna před fragmentací (Tunc *et al.*, 2009). Antioxidační účinky česneku mohou být zajištěny regulací produkce gasotransmiterů, kterými jsou sirovodík (H<sub>2</sub>S), oxid dusnatý (NO) a oxid uhelnatý (CO). Gasotransmitery jsou plynné molekuly se signální funkcí v mnoha tkáních. V reprodukční soustavě se podílí na regulaci meiotického zrání spermií a vajíček (Mustafa *et al.*, 2009). Při zrání prasečích oocytů zvyšuje sirovodík akceleraci tohoto děje a zvyšuje aktivitu MPF během GVBD (Nevoral *et al.*, 2013). V *in vitro* podmínkách je přítomnost oxidu dusnatého nezbytná pro realizaci GVBD u prasečích oocytů a pro dosažení metafáze 2. meiotického dělení. Jestliže jsou inhibovány enzymy produkující oxid dusnatý v kumulu nebo jsou přerušeny *gap- junctions* spoje, je potlačena kumulární expanze (Chmelíková *et al.*, 2010).

Gasotransmitery v buňkách pravděpodobně snižují OS, čímž například NO a H<sub>2</sub>S ochraňují buňky před ischemicko-reperfúzním poškozením. Potlačují tak buněčnou smrt a upravují funkce mitochondrií (Mustafa *et al.*, 2009).

Česnek má schopnost regulovat tvorbu gasotransmiterů. Jejich produkci může zvýšit, jako je tomu u NO a H<sub>2</sub>S. Prostřednictvím česneku uvolněný sirovodík brání kardiomyocyty před fosforylací antiapoptotického ERK1/2 proteinu, snížením poměru Bax/Bcl2 a snížením fosforylace proapoptotických p-38MAPK (Tunc *et al.*, 2009).

## **5 Materiál a metody**

### **5.1 Aspirace a selekce oocytů pro experimentální účely**

Pro účely této diplomové práce byly používány oocyty získávané z ovariálních folikulů dosud necyklujících pre-pubertálních prasniček. Po vyjmutí z jatečných těl byly vaječníky uloženy do termosky s fyziologickým roztokem (0,9% roztok NaCl) zahřátým na 39°C a ihned převáženy na Katedru veterinárních disciplín.

Po převozu do laboratoře byly oocyty společně s folikulární tekutinou aspirovány z folikulů o velikosti 2 – 5 mm do injekční stříkačky pomocí jehly 20 G. Pod stereomikroskopem se oocyty z folikulární tekutiny izolovaly tenkou skleněnou kapilárou. Pro experimenty byly vybírány jen plně dorostlé meioticky kompetentní oocyty s kompaktní vrstvou kumulárních buněk a neporušenou cytoplazmou.

Kultivaci předcházely trojnásobný proplach oocytů v kultivačním mediu. Samotná kultivace probíhala ve čtyřjamkové destičce 4-well multidish (Nunc, Denmark) v 1 ml modifikovaného kultivačního média M199 (Sigma-Aldrich, USA). V tomto mediu je obsažen hydrogenuhličitan sodný, laktát vápenatý, gonadotropní hormony eCG a hCG, gentamycin, HEPES, a 10 % (v/v) fetálního bovinního séra (GibcoBRL; Life Technologies, Deutschland). Kultivace probíhá v prostředí řízené atmosféry 5 % CO<sub>2</sub> ve směsi se vzduchem. Teplota byla udržována na 39 °C a kultivace probíhala 24 a 48 hodin.

Pro experiment byly stanoveny dvě skupiny oocytů, experimentální a kontrolní. Experimentální skupina oocytů byla kultivována s přidáním S-allyl cysteinu do kultivačního média v množství 0,1 mM, 0,5 mM a 1 mM.

### **5.2 Vyhodnocení stadia meiotického zrání**

Po ukončení kultivace byly oocyty opakovaným nasáváním do tenkostěnné kapiláry zbaveny kumulárních buněk. Následně byly tyto oocyty montovány mezi podložní a krycí sklíčko a nafixovány roztokem kyseliny octové a etanolu v poměru 1:3. Fixování probíhalo po dobu 48 minut. Nafixované oocyty byly poté obarveny 1% roztokem orceinu.

U takto upravených oocytů byla stadia meiotického zrání hodnocena pod mikroskopem s fázovým kontrastem. Na základě tohoto pozorování byly oocyty rozděleny do několika skupin: GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku (germinal vesicle), LD – oocyty ve fázi pozdní diakineze (late diakinesis), MI – metafáze 1. meiotického dělení, AITI – oocyty



přecházející z anafáze do telofáze 1. meiotického dělení a nakonec MII – metafáze 2. meiotického dělení (Motlík et Fulka, 1976).

### **5.3 Vyhodnocení exprese markerů časně apoptózy**

Sledovanými časnými markery apoptózy byly proteiny Bax a Bcl-2. Metoda imunocytochemické lokalizace proteinů byla provedena podle postupu publikovaného v práci Yi *et al.* (2014). Po ukončení kultivace byly oplozené oocyty fixovány ve 2% formaldehydu při laboratorní teplotě po dobu 40 min. Následně byly oocyty propláchnuty v PBS-NaN<sub>3</sub>, permeabilizovány v PBS-NaN<sub>3</sub> s 0,1% Triton-X-100 (PBS-NaN<sub>3</sub>-TX) 40 minut a blokovány v roztoku 5% NGS (Normal Goat Serum) v PBS-NaN<sub>3</sub>-TX. Oocyty byly inkubovány s primární myší protilátkou anti-Bax a králičí anti-Bcl-2 (Abcam, USA; 1:200 v 1% NGS v PBS-NaN<sub>3</sub>-TX), přes noc při 4 °C. Následně byly oocyty dvakrát opláchnuty a inkubovány se sekundární protilátkou anti-myší a králičí IgG konjugovanou s fluoresceinem isothiokyanátem (FITC) nebo tetramethylrhodaminem (TRITC), po dobu 40 minut při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace byly oocyty dvakrát opláchnuty a montovány do montovacího média Vectashield s DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole, Vector Laboratories, USA). Z namontovaných oocytů byly vyhotoveny obrázky pomocí invertovaného mikroskopu (Nikon, Japan) při excitační vlnové délce 450-490 nm, kamery Clara CCD Camera (Andor technology, UK) a softwaru NIS Elements 2.30 (Laboratory Imaging, Czech Republic).

### **5.4 Analýza obrazu**

Získané obrázky z připravených preparátů byly podrobeny analýze obrazu v programu NIS Elements (laboratory Imaging, Czech Republic). V oocytech byla měřena intenzita signálu fluoresceinu navázaného v místě sledovaného faktoru, signál byl kvantifikován a rozdíl mezi oocyty kontrolní skupiny a oocyty inkubované s různou koncentrací SAC vyhodnocen. Současně byla provedena analýza kolokalizace barevných signálů FITC a TRITC, pomocí vyjádření Pearsonova korelačního koeficientu a Manderova koeficientu překrytí.

## **5.5 Statistická analýza**

Každý experiment byl opakován šestkrát. Výsledky pokusů byly zpracovány statistickým programem SAS 9.1 za pomoci parametrického testu ANOVA (t-test). Rozdíly s hodnotou  $P < 0,05$  byly považovány za statisticky významné.

## 6 Výsledky

V rámci této diplomové práce byly provedeny pokusy zaměřené na vliv S-allyl cysteinu na průběh meiotického zrání prasečích oocytů při *in vitro* kultivaci. Druhá část byla zaměřena na hodnocení inhibičního vlivu S-allyl cysteinu na apoptózu prasečích oocytů zrajících v *in vitro* podmínkách.

### 6.1 Vliv S-allyl cysteinu na průběh jaderného zrání

Cílem experimentu bylo zhodnotit vliv SAC na průběh meiotického zrání po 24 a 48 hod. *in vitro* kultivace. Výsledky prokázaly, že S-allyl cystein v dávkách 0,1; 0,5 a 1 mM neovlivnil průběh meiotického jaderného zrání po 24 hod. (Tab.1), případné rozdíly jsou statisticky nevýznamné. Oocyty všech experimentálních skupin tak dosáhly stádia metafáze I z 89,5 – 96,6 %. Podobně také po 48 hod. *in vitro* kultivace dosáhly oocyty z 91,0 – 94,3 % stádia metafáze II (tab. 2). Rozdíly mezi kontrolní a experimentálními skupinami nejsou statisticky významné.

**Tab. 1 Jaderné zrání oocytů po 24 hodinové kultivaci v přítomnosti S-allyl cysteinu**

	Stadium meiotického zrání (% ± S.E.M.)						n
	GV	LD	MI	AI/TI	MII	Dg	
<b>Kontrola</b>	3,7 ± 1,7 <sup>a</sup>	4,1 ± 0,9 <sup>a</sup>	89,5 ± 2,2 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	2,7 ± 1,2 <sup>a</sup>	21
<b>0,1 mM SAC</b>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	96,6 ± 1,1 <sup>a</sup>	2,6 ± 1,2 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,8 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	21
<b>0,5 mM SAC</b>	5,7 ± 1,5 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,9 <sup>a</sup>	92,5 ± 1,2 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,9 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	21
<b>1 mM SAC</b>	1,7 ± 1,1 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,8 <sup>a</sup>	93,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,8 <sup>a</sup>	21

SAC - S-allyl cystein; GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku (germinal vesicle); LD – oocyty ve stádiu pozdní diakineze (late diakinesis), MI – oocyty ve stádiu metafáze I, AI/TI – oocyty ve stádiu přechodu z anafáze I do telofáze I, MII – oocyty ve stádiu metafáze II, Dg – oocyty s degenerovaným chromatinem. a- statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a experimentálními skupinami ( $p < 0.05$ ).

**Tab. 2 Jaderné zrání oocytů po 48 hodinové kultivaci v přítomnosti S-allyl cysteinu**

	Stadium meiotického zrání (% ± S.E.M.)						n
	GV	LD	MI	AI/TI	MII	Dg	
<b>Kontrola</b>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,6 ± 1,6 <sup>a</sup>	1,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	92,7 ± 0,9 <sup>a</sup>	4,2 ± 1,9 <sup>a</sup>	25
<b>0,1 mM SAC</b>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	2,4 ± 1,0 <sup>a</sup>	2,4 ± 1,0 <sup>a</sup>	93,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	1,7 ± 1,0 <sup>a</sup>	25
<b>0,5 mM SAC</b>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	3,4 ± 2,1 <sup>a</sup>	2,3 ± 1,5 <sup>a</sup>	94,3 ± 2,4 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	25
<b>1 mM SAC</b>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,8 <sup>a</sup>	2,4 ± 1,0 <sup>a</sup>	3,4 ± 1,6 <sup>a</sup>	91,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	2,5 ± 1,0 <sup>a</sup>	25

SAC - S-allyl cystein; GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku (germinal vesicle); LD – oocyty ve stádiu pozdní diakineze (late diakinesis), MI – oocyty ve stádiu metafáze I, AI/TI – oocyty ve stádiu přechodu z anafáze I do telofáze I, MII – oocyty ve stádiu metafáze II, Dg – oocyty s degenerovaným chromatinem. a - statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a experimentálními skupinami ( $p < 0.05$ ).

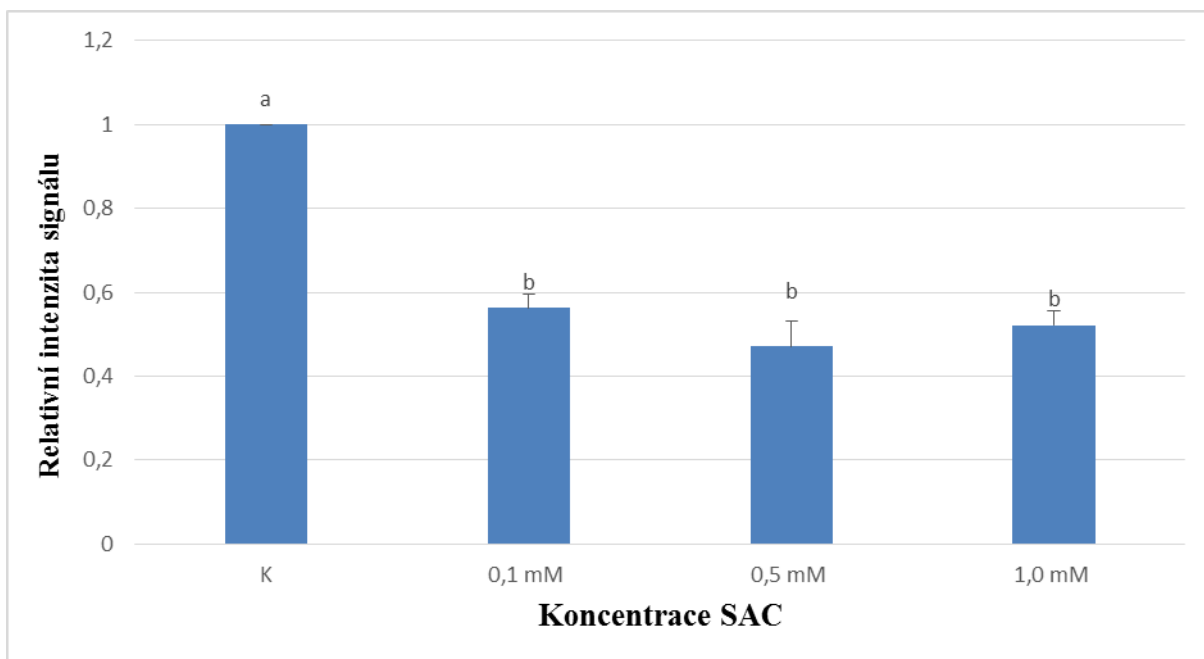
## **6.2 Vliv S-allyl cysteinu na expresi markerů časné apoptózy ve zrajících oocytech**

Cílem experimentů bylo zhodnotit vliv SAC na expresi markerů časné apoptózy, anti-apoptotického faktoru Bcl-2 a pro-apoptotického faktoru Bax, během meiotického zrání oocytů. Výsledky byly zjišťovány po 24. a 48. hodinové kultivaci *in vitro*. SAC byl do kultivačního media přidáván vždy v dávkách 0,1; 0,5 a 1 mM.

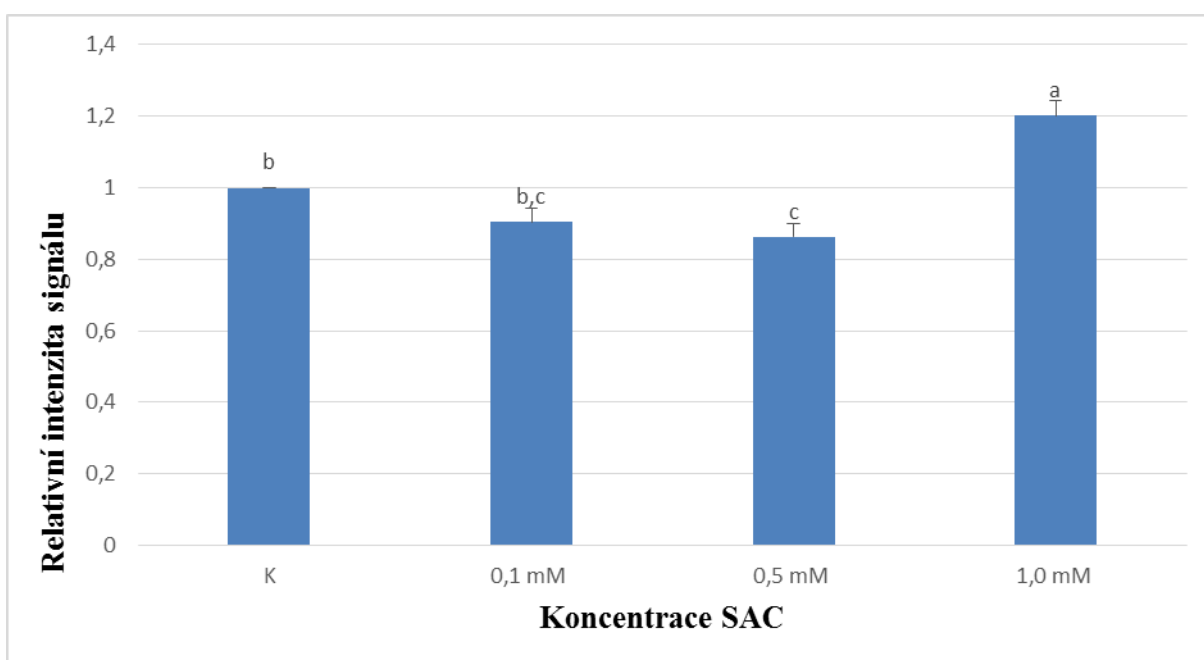
### **6.2.1 Vliv S-allyl cysteinu na expresi Bcl-2 ve zrajících oocytech**

Anti-apoptotický faktor vnitřní signální dráhy, protein Bcl-2, vykazoval po 24 hodinové kultivaci se SAC oproti kontrolní skupině snížení exprese v jakékoli koncentraci SAC. Exprese proteinu byla oproti kontrolní skupině nejvíce snížena v případě, kdy byl aplikován SAC v koncentraci 0,5 mM. Tehdy poklesla o 52,9%. Případné rozdíly mezi experimentálními skupinami byly statisticky nevýznamné (Viz obrázek č.1).

Při *in vitro* kultivaci po dobu 48 hodin vykazoval anti-apoptotický protein Bcl-2 statisticky významné zvýšení exprese v případě, že byly oocyty kultivovány s přidavkem SAC v množství 1mM. V tomto případě došlo k 20,2 % nárůstu intenzity signálu Bcl-2 oproti kontrolní skupině. Naopak, pokud byl přidán SAC v koncentraci 0,5 mM, následoval pokles exprese proteinu oproti kontrolní skupině o 13,8%, tedy statisticky významný. Rozdíl byl tedy statisticky významný mezi kontrolní skupinou a skupinou oocytů kultivovaných s přidavkem 0,5 a 1 mM SAC. Naopak mezi skupinami kontrolní a s přidavkem 0,1 SAC byl rozdíl statisticky nevýznamný. V rámci experimentálních skupin byl statisticky významný rozdíl mezi skupinou s koncentrací 1Mm SAC a druhými dvěma. Oproti skupině 0,1mM SAC došlo k nárůstu o 29,9%, v porovnání se skupinou s 0,5 mM SAC vzrostla exprese o 33,9% (viz obrázek č.2).



**Obrázek 1: Expres anti-apoptického faktoru Bcl-2 v prasečích oocytech po 24 hod. *in vitro* kultivace.** K – kontrola; SAC – S-allyl cystein; <sup>a,b</sup> Statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a experimentálními skupinami ( $p < 0.05$ ).

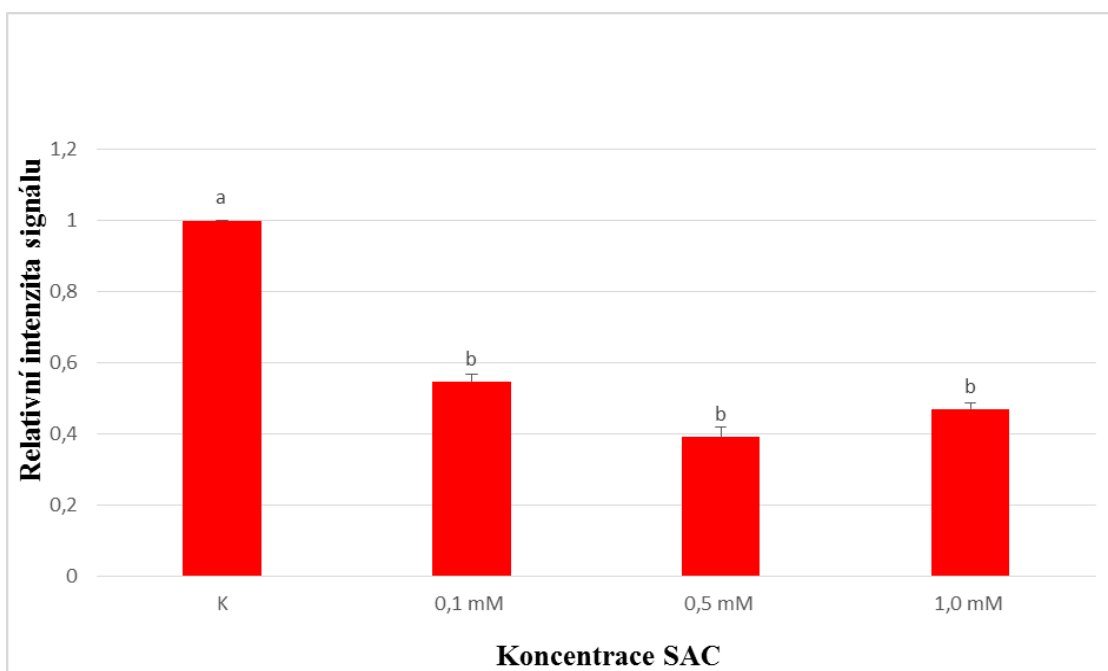


**Obrázek č.2: Expres anti-apoptického faktoru Bcl-2 v prasečích oocytech po 48 hod. *in vitro* kultivace** K – kontrola; SAC – S-allyl cystein; <sup>a,b,c</sup> Statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a experimentálními skupinami ( $p < 0.05$ ) pro expresi proteinu Bcl-2.

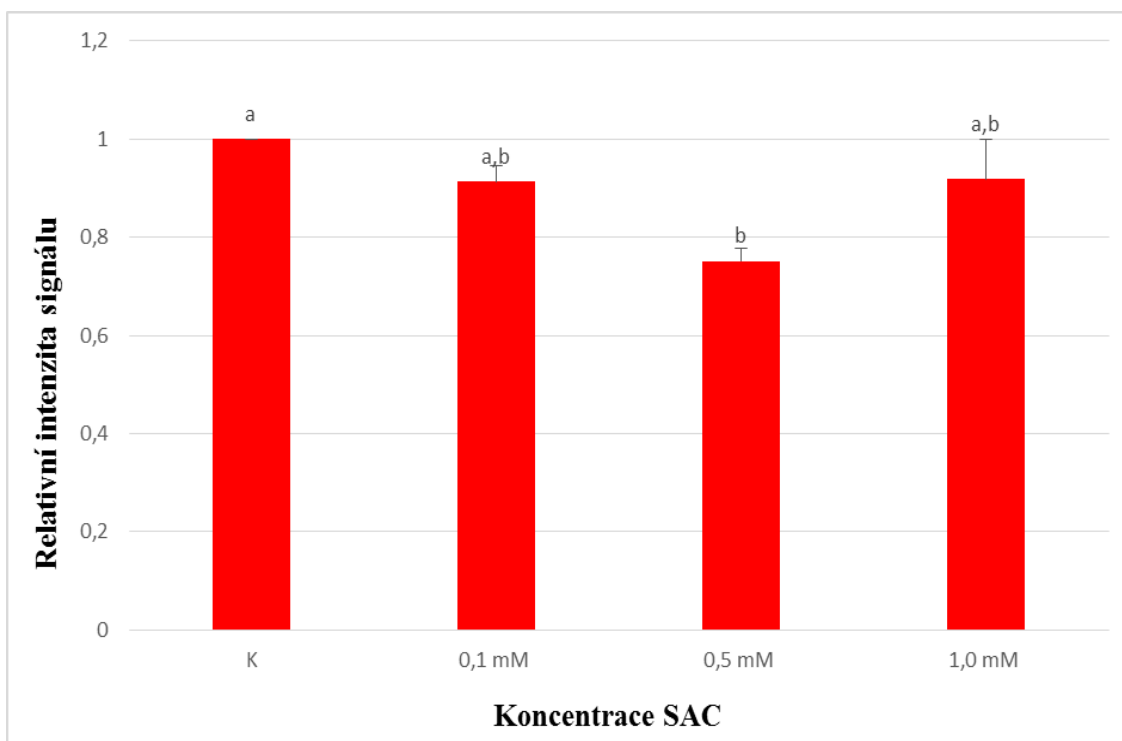
### 6.2.2 Vliv S-allyl cysteinu na expresi Bax ve zrajících oocytech

Bax je pro-apoptotický protein vnitřní signální dráhy apoptózy. Výsledky pokusů ukázaly, že jestliže byl při 24 hodinové kultivaci oocytů *in vitro* přidán do kultivačního média SAC, intenzita signálu faktoru Bax se oproti kontrolní skupině výrazně snížila ve všech případech. Nejvýrazněji však při dávce 0,5 Mm, o 61%. (Viz obrázek 3)

V případě, kdy byly oocyty kultivovány s přidavkem SAC po dobu 48 hodin, byl pokles intenzity signálu Bax oproti kontrolní skupině statisticky významný pouze v případě aplikování dávky 0,5 mM, kdy se jednalo o pokles o 24,9 %. V rámci experimentálních skupin byl zjištěn statisticky významný pokles intenzity signálu ve skupině s 0,5 mM SAC oproti zbylým dvěma skupinám. Vůči skupině s přidavkem 0,1 mM SAC bylo pozorováno snížení o 16,2%, v porovnání se skupinou s 1 mM byl pokles 16,7%ní. (Viz obrázek 4).



**Obrázek č.3: Expres pro-apoptického faktoru Bax v prasečích oocytech po 24 hod. *in vitro* kultivace.** K – kontrola; SAC – S-allyl cystein; <sup>a,b,c</sup> Statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a experimentálními skupinami ( $p < 0.05$ ) pro expresi proteinu Bax.



**Obrázek č.4: Expres pro-apoptického faktoru Bax v prasečích oocytech po 48 hod. *in vitro* kultivace** K – kontrola; SAC – S-allyl cystein; <sup>a,b</sup> Statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a experimentálními skupinami ( $p < 0.05$ ) pro expresi proteinu Bax.

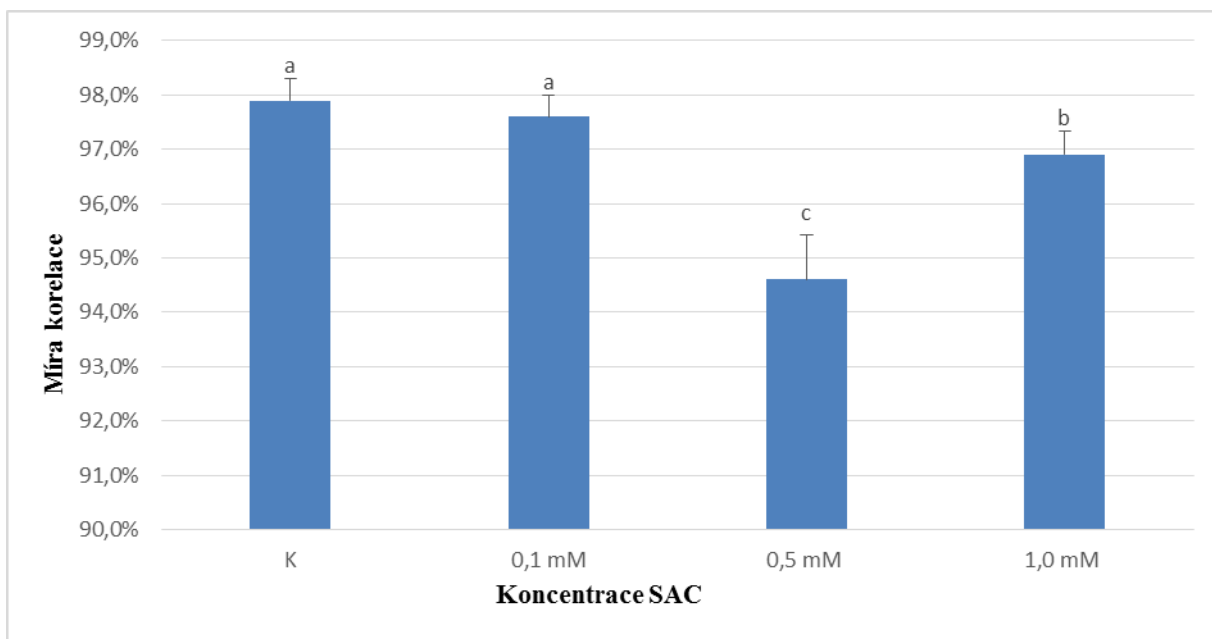


### **6.2.3 Kolokalizace Bcl-2 a Bax**

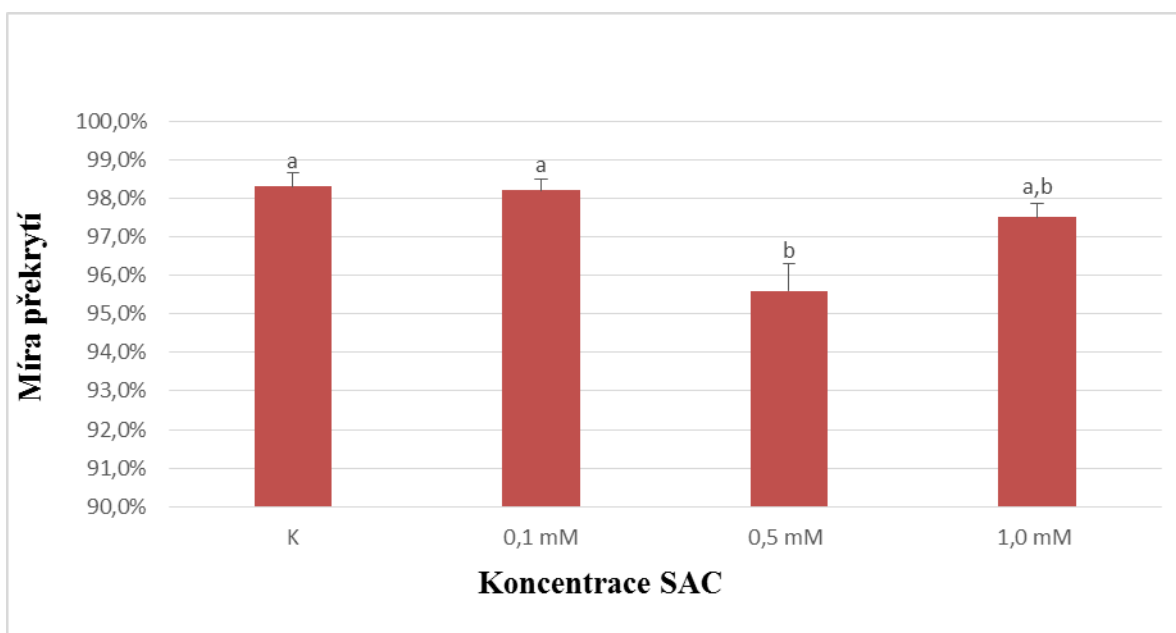
Byla provedena analýza kolokalizace barevných signálů FITC a TRITC. Vzájemný poměr a společná distribuce Bcl-2 a Bax ve zrajících oocytech byly hodnoceny za pomoci Pearsonova korelačního koeficientu a Manderova koeficientu překrytí. Pearsonův koeficient vypovídá o korelaci obou fluorescenčních signálů, Manderův koeficient poukazuje na míru překryvu obou signálů, bez ohledu na sílu vyzařování jednotlivých signálů.

#### ***6.2.3.1 Výsledky kolokalizace po 24 hodinách kultivace in vitro***

Z obrázku 5 i 6 je patrné, že oba koeficienty ve všech případech, kdy byl přidán SAC do kultivačního média, překročily hodnotu 0,9. Z toho vyplývá, že faktory Bcl-2 a Bax jsou na sobě závislé a vyskytují se na stejných místech, popřípadě jsou na sebe vázány formou heterodimerů. Mezi experimentálními skupinami to nejvíce bylo patrné u oocytů s přídavkem 0,1 mM SAC, kdy byla míra korelace výskytu 97,6 %. Oproti kontrolní skupině byl statisticky významný pokles paralelního výskytu faktorů Bcl-2 a Bax v případě, kdy byl přidán SAC v dávce 0,5 mM. Jednalo se o snížení o 3,3%. Výstupní hodnoty tohoto množství SAC byly nižší i v porovnání s druhými dvěma experimentálními skupinami. V porovnání s oocyty s přídavkem 0,1 mM SAC se jednalo o snížení souběžného výskytu o 3%, oproti skupině s 1mM SAC byl pokles 2,3%. Manderovo překrytí se oproti kontrolní skupině statisticky významně snížilo, pouze pokud bylo přidáno 0,5 mM SAC. Překrytí signálů pokleslo o 2,7%. Statisticky významný rozdíl se vyskytnul i mezi experimentálními skupinami. U oocytů s přídavkem 0,5 mM SAC byl v porovnání se skupinou s 0,1 mM SAC pozorován pokles překryvu o 2,6%. Vůči oocytům kultivovaným s 1 mM SAC se projevil pokles o 2,3%.



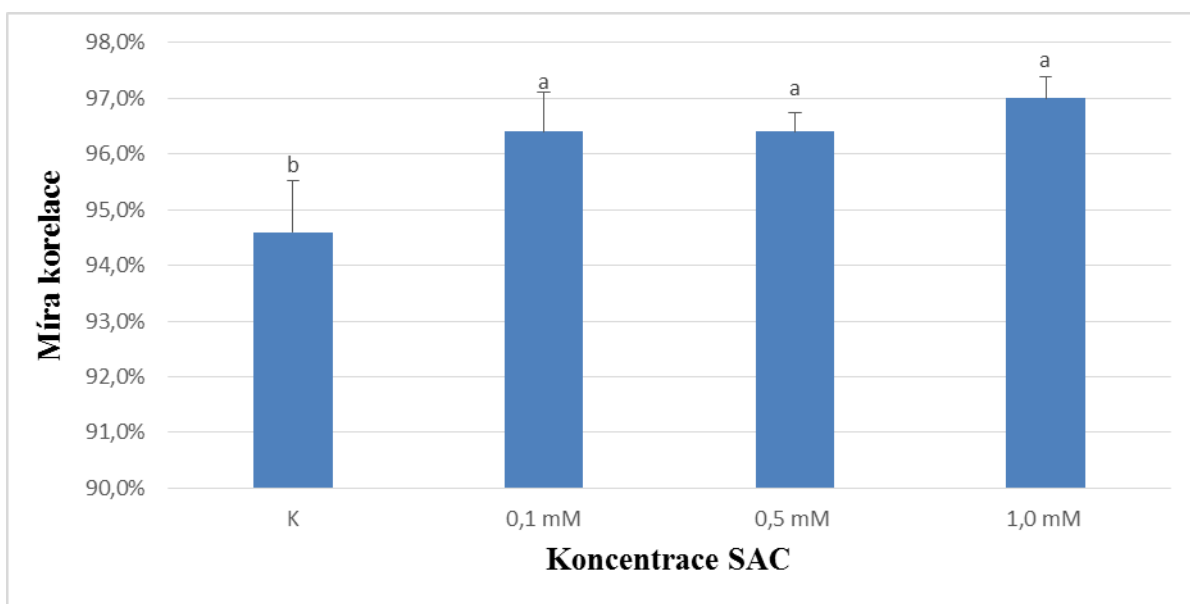
**Obrázek č. 5: Pearsonova korelace výskytu proteinů Bax a Bcl v prasečích oocytech po 24 hod. *in vitro* kultivace.** K – kontrola; SAC – S-allyl cystein; <sup>a,b,c</sup> Statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a experimentálními skupinami ( $p < 0.05$ ) pro souběžný výskyt proteinů



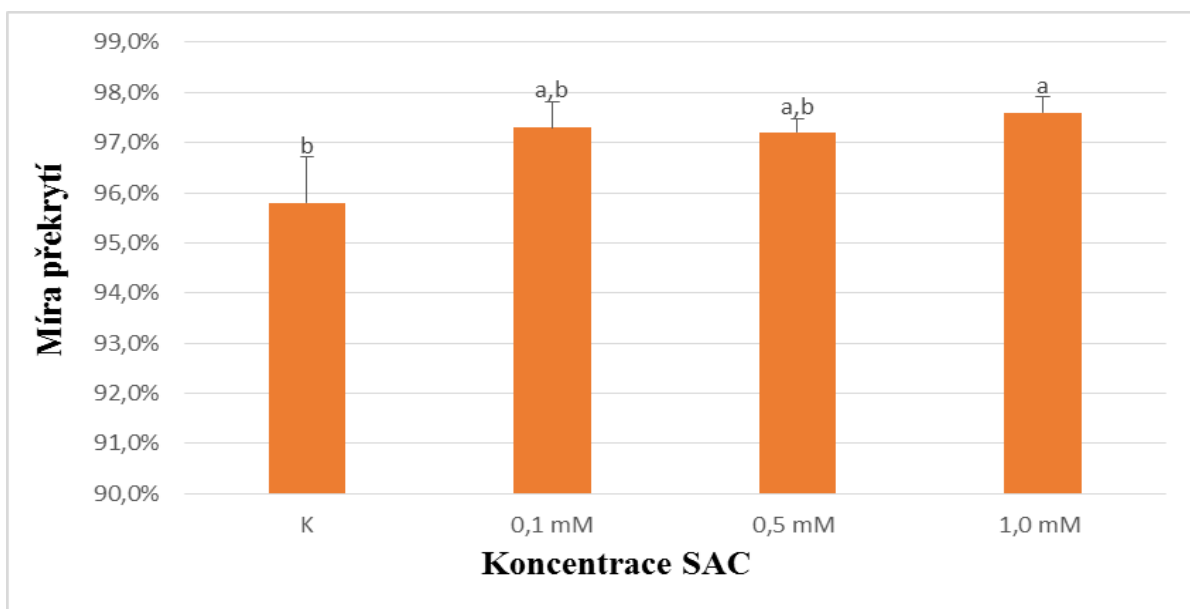
**Obrázek č. 6: Manderovo překrytí výskytu proteinů Bax a Bcl v prasečích oocytech po 24 hod. *in vitro* kultivace.** K – kontrola; SAC – S-allyl cystein; <sup>a,b</sup> Statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a experimentálními skupinami ( $p < 0.05$ ) pro překryv proteinů

### **6.2.3.2 Výsledky kolokalizace po 48 hodinách kultivace in vitro**

Stejně jako v předchozím případě, i zde je z obrázku 7 i 8 patrné, že oba koeficienty ve všech případech, kdy byl přidán SAC do kultivačního media překročily hodnotu 0,9. Oba ukazatele byly nejvyšší v případě, že byl přidán SAC v množství 1mM, korelace oproti kontrole stoupla o 2,4%, překryv obou faktorů stoupl o 1,8%. Korelace výskytu pro-apoptického a anti-apoptického faktoru stoupla i u skupin s přidavkem SAC v koncentracích 0,1 a 0,5 mM. V obou případech to bylo o 1,8%. V míře překryvu oocyty v experimentálních skupinách se SAC v koncentracích 0,1 a 0,5 mM nevykazovaly statisticky významný rozdíl oproti kontrole.



**Obrázek č. 7: Pearsonova korelace výskytu proteinů Bax a Bcl v prasečích oocytech po 48 hod. *in vitro* kultivace. K – kontrola; SAC – S-allyl cystein; <sup>a,b</sup> Statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a experimentálními skupinami ( $p < 0.05$ ) pro souběžný výskyt proteinů**



**Obrázek č. 8: Manderovo překrytí výskytu proteinů Bax a Bcl v prasečích oocytech po 48 hod. *in vitro* kultivace. K – kontrola; SAC – S-allyl cystein; <sup>a,b</sup> Statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a experimentálními skupinami ( $p < 0.05$ ) pro překryv proteinů**

## 7 Diskuze

Během meiotického zrání prodělávají oocyty mnoho změn, které mají dopad na jejich kvalitu. Nejvýznamnější z těchto dějů je nástup programované buněčné smrti, apoptózy (Koopman *et al.*, 1994). Programovaná buněčná smrt může být spuštěna řadou faktorů endogenního a exogenního původu, mezi něž můžeme zahrnout například oxidativní stres, hormonální nerovnováhu a neadekvátní účinek růstových faktorů (Morita and Tilly, 1999). Apoptotický proces je jedním z klíčových faktorů, které ovlivňují životaschopnost oocytů v *in vitro* prostředí.

Apoptóza je mimo jiných faktorů řízena také proteiny ze skupiny Bcl-2, kam patří i pro-apoptotický protein Bax, který je klíčovým faktorem apoptózy probíhající v ovariální tkáni (Felici *et al.*, 1999). Dalším faktorem zahrnutým v regulaci procesu buněčné smrti je anti-apoptotický protein Bcl-2, který s proteinem Bax tvoří heterodimery a ovlivňuje tak jeho fungování (Bouilett *et al.*, 1999).

Expresí těchto faktorů může být ovlivněna použitím látek s anti-oxidační aktivitou (Iciek *et al.*, 2009). Mezi látky, které mírní projevy apoptózy, patří i sirné sloučeniny získávané z česneku. *In vitro* pokusy poukazují na fakt, že za příznivé účinky česneku je zodpovědný především S-allyl cystein (SAC) s vysokým antioxidantním potenciálem (Cervantes *et al.*, 2013). Sirná sloučenina SAC je hlavní složkou vyzrálého česnekového extraktu (Corzo-Martinez *et al.*, 2007).

Z experimentů provedených v rámci této diplomové práce vyplývá, že SAC ovlivňuje některé studované ukazatele meiotického zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách. Výsledky pokusů prokázaly, že exprese anti-apoptotického proteinu Bcl-2 po 24 i 48 hod. kultivaci se SAC oproti kontrolní skupině kolísala v závislosti na přidaném množství SAC. Po 24 hod. kultivaci jeho exprese, stejně jako v případě proteinu Bax, klesla nejvíce v případě, že byl aplikován SAC v koncentraci 0,5 mM. Pokles exprese obou proteinů by mohl znamenat, že tyto faktory netvořily heterodimery a že proapoptotický faktor Bax se nacházel v cytoplasmě. Pravděpodobně tak nedocházelo k jeho translokaci do mezimembránového prostoru mitochondrií, kde by umožnil uvolnění cytochromu C a indukci apoptózy (Gross *et al.*, 1999). Minimální množství Bax se však v membráně mitochondrií nachází, aniž by byla apoptóza indukována (Kirkin *et al.*, 2004).

V případě, že byl SAC přidán v množství 1,0 mM k oocytům podstupujícím 48 hod. kultivaci, exprese Bcl-2 se rapidně zvýšila a apoptóza byla potlačena. Jestliže se Bcl-2 proteiny v buňce nachází ve zvýšené míře, je pravděpodobné, že vytváří homodimery a brání

tak apoptóze (Jin and El-Deiry, 2005). Pokud bylo při této době kultivace aplikováno 0,5 mM SAC, exprese Bax i Bcl-2 oproti kontrolní skupině klesla, avšak signál Bcl-2 vztažený k oocytům kontrolní skupiny byl silnější, než signál Bax a apoptóza byla potlačena. Již dříve bylo popsáno, že heterodimerací s pro-apoptotickými faktory brání Bcl-2 proteiny dimeraci pro-apoptotických proteinů mezi sebou ve vnější membráně mitochondrií. Bcl-2 proteiny mohou vytvářet s Bax antiapoptotické heterodimery a pro-apoptotické působení Bax je tak možné inhibovat (Petros *et al.*, 2004). Bcl-2 vyvazuje některé pro-apoptotické proteiny, čímž brání jejich oligomerizaci a inserci do vnější mitochondriální membrány (Danial, 2007). Stejně tak je známé působení Bax a jeho schopnost inhibice Bcl-2 proteinů, avšak je-li jeho množství v buňce deficitní, vede to k neschopnosti vyvazovat represory apoptózy (Boulett *et al.*, 1999).

Výsledky kultivace oocytů se SAC prokázaly, že exprese Bcl-2 a Bax jsou na sobě závislé a vyskytují se současně a pravděpodobně v heterodimerech. Po 24 hod. kultivaci se paralelní výskyt a překryv faktorů Bcl-2 a Bax oproti kontrole snížil, naopak po 48 hod. kultivaci stoupl.

Poměr Bcl-2 a Bax, někdy označovaný jako tzv. Bcl-2/Bax reostat, je kontrolním bodem, po jehož překročení je proces apoptózy ireverzibilní (Danial and Korsmeyer, 2004). Základní stav buňky vychází z rovnováhy anti-apoptotických a pro-apoptotických faktorů. Pokud dojde k aktivaci stresové JNK kinázy z řad MAP kináz, jsou indukovány pro-apoptotické faktory, včetně Bax. Naopak, jestliže se aktivují růstové faktory, indukují se anti-apoptotické faktory, včetně Bcl-2 a buňka přežívá (Clarke and Tyler, 2009).

Dalším možným způsobem, jak SAC na ukazatele meiotického zrání působí, je eliminování oxidativního stresu způsobeného reaktivními kyslíkovými skupinami (ROS) (Iciek *et al.*, 2009). ROS se vyskytují v organismu fyziologicky, protože vznikají během metabolických procesů, odehrávajících se v oocytu a v buňkách k němu přilehlých (Agarwal *et al.*, 2005), ale stejně jako nedostatek působí i přemíra ROS na buňku negativně. Hladina ROS je v organismu vyrovnávána pomocí antioxidantů (Brigelius and Flohe, 1999). Jestliže je rovnováha mezi produkcí volných radikálů a antioxidační aktivitou tkání narušena, nastává v buňce oxidativní stres (OS) (Luberda, 2005). Redukčně-oxidační status buňky, vzcházející z přemíry ROS a poklesu hladin antioxidantů je jedním z faktorů podněcujících apoptózu (Otto *et al.* 2007).

V *in vitro* podmínkách se nejčastěji setkáváme se zvýšenou hladinou ROS, protože kultivační médium nemá vyvážený poměr mezi vznikajícími ROS a antioxidačními pochody (Esfandiary *et al.*, 2005). Přidání SAC ke kultivovaným oocytům v jakékoliv koncentraci

(0,1; 0,5 a 1 mM) sice nemělo efekt na samotný průběh meiotického zrání po 24, ani po 48 hod. *in vitro* kultivace, ale působilo na expresi markerů apoptózy, proteinů Bax a Bcl-2, možná právě prostřednictvím snížení hladiny ROS. Další možností, jak SAC mohl během kultivací ovlivnit expresi Bax a Bcl-2, je prostřednictvím gasotransmiterů NO a H<sub>2</sub>S, jejichž produkci má schopnost zvyšovat (Tunc *et al.*, 2009). Gasotransmitery v buňkách pravděpodobně snižují OS, čímž například NO a H<sub>2</sub>S ochraňují buňky před ischemicko-reperfúzním poškozením. Potlačují tak buněčnou smrt a modulují funkce mitochondrií (Mustafa *et al.*, 2009). Sírné sloučeniny česneku mají schopnost regulovat uvolňování a genezi gasotransmiterů. Jejich produkci může zvýšit, jako je tomu u NO a H<sub>2</sub>S. H<sub>2</sub>S uvolněný prostřednictvím česneku snížil poměr Bax/Bcl-2 ve prospěch Bcl-2 (Tunc *et al.*, 2009). Lze tedy předpokládat, že přidání SAC do kultivačního media zvýší hladinu gasotransmiterů v buňce, čímž je snížen OS. Snížení OS v oocytech kultivovaných *in vitro* je užitečné pro úspěšnější oplození těchto oocytů, embryonální vývoj a tady pokrok reprodukčních biotechnologií.

## 8 Závěr

Výsledky potvrdily hypotézu, že SAC ovlivňuje expresi Bcl-2 a Bax, míru jejich výskytu a překryvu ve zrajících oocytech prasete kultivovaných v podmínkách *in vitro*.

Pro biotechnologie užívané v reprodukci je zásadním předpokladem pro práci dostatečný počet plnohodnotných, vývojově kompetentních oocytů. Během *in vitro* zrání oocytů se může kromě fyziologicky probíhajících biochemických změn odehrát řada negativně působících procesů, které ovlivní kvalitu a životaschopnost zrajících oocytů, a tím i jejich vývojovou kompetenci. Jedním z těchto procesů je apoptóza, k níž dochází často v důsledku zvýšené produkce ROS.

Přísunem antioxidantů z vnějšího prostředí může být potlačen projev apoptózy. Mezi látky, které mírní projevy apoptózy, patří sirné sloučeniny obsažené v česneku, zejména S-allyl cystein (SAC) s vysokým antioxidantním potenciálem.

Výsledky prokázaly, že SAC v jakékoli koncentraci neovlivnil průběh meiotického zrání po 24 ani po 48 hod. *in vitro* kultivace. Expres proteinu Bcl-2 po 24 i 48 hod. kultivaci se SAC oproti kontrolní skupině kolísala v závislosti na přidaném množství SAC, v případě proteinu Bax klesla po 24 hod. i 48 hod. kultivaci. Výsledky 24 hod. kultivace oocytů se SAC prokázaly, že Bcl-2 a Bax jsou na sobě závislé a vyskytují se současně, popřípadě v heterodimerech. Po 24 hod. kultivaci se paralelní výskyt a překryv faktorů Bcl-2 a Bax oproti kontrole snížil, naopak po 48 hod. kultivaci stoupl.

Další experimenty jsou plánované k objasnění vlivu distribuce proteinů z rodiny Bcl-2 na následný embryonální vývoj po *in vitro* oplození těchto oocytů. Objasnění dynamiky těchto faktorů pomůže zvýšit efektivitu *in vitro* kultivace oocytů a produkce embryí schopných dalšího transferu do těla příjemkyň.



## 9 Seznam použité literatury

Abud, H. E. 2004. Shaping developing tissues by apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 11 (8). 797 – 799.

Adams, J. M., Cory, S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 281 (5381). 1322 – 1326.

Adhikari, D., Liu, K. 2013. Regulation of quiescence and activation of oocyte growth in primordial follicles. In: Albertini, D. F., De Santis, L., G. Coticchio *et al.* (eds.), *Oogenesis*. Springer. London. p. 49 – 59.

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

Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R. 2005. Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician's perspective. *Reproductive BioMedicine Online*. 11:641–650. [PubMed: 16409717]

Akkoyunlu, G., Ustünel, I., Demir, R. 2007. The distribution of transglutaminase in the rat oocyte and embryos. *Theriogenology*. 68 (6). 834 – 841.

Albertini, D. F., Wassarman, P. M., 1994. The mammalian ovum. In: Knobil, E., Neil, J. D. (eds.). *The physiology of reproduction*. Raven press, Ltd. New York. p. 79-114.

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Luis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing. Ústí nad Labem. p. 630. ISBN: 8090290620.

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

Ambruosi BI, Uranio MF, 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.

Andreu-Vieyra, C. V., Habibi, H. R. 2000. Factors controlling ovarian apoptosis. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 78 (12). 1003 – 1012.

Attaran, M., Pasqualotto, E., Falcone, T., 2000. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in-vitro fertilization. International Journal of Fertility and Women's Medicine. p 314–320. [PubMed: 11092702]

Banerjee, S. K., Mukherjee, P. K. and Maulik, S. K. (2003) Garlic as an antioxidant: The good, the bad and the ugly. Phytotherapy Research, 17, 97-106.

Brigelius-Flohe, R., 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Radical Biology and Medicine. p.951–965. [PubMed: 10569628]

Brodnitz MH, Pascale JV, van Derslice L. 1971. Flavor components of garlic extract. J Agric Food Chem 19:273–275.

Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D. C., Tarlinton, D. M., Kay, T. W., Köntgen, F., Adams, J. M., Strasser, A. 1999. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. Science. 286 (5445). 1735 – 1738.

Cervantes, M. I., Balderas, P. M. D., Gutierrez-Banos, J. D., 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., Castaneda-Saucedo, E., Pedraza-Chaverri, J., Calzada, F. and 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.

Chmelíková E, Jeřeta M, Sedmíková M, Petr J, Tůmová L, Kott T, Lipovová P, Jílek F (2010) Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. Zygote, 18: 235-244.

- Clarke, P. a K. L. Tyler. 2009. Apoptosis in animal models of virus-induced disease. *Nat. RevMicrobiol* 7(2): 144-155.
- Ciplea AG, Richter KD (1988) The protective effect of *Allium sativum* and *crataegus* on isoprenaline-induced tissue necroses in rats. *Arzneimittelforschung*, 38 (11): 1583 – 1592.
- Cooper, G. M. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd ed. Sinauer Associates. Sunderland. p. 689. ISBN: 0878931066.
- Corzo-Martinez M, Corzo N, Villamiel M. 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci Technol* 18:609–625.
- Danial, N. N. 2007. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res*. 13(24): 7254-7263.
- Danial, N. N., Korsmeyer. S. J. 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116(2): 205-219.
- Das, S., Chattopadhyay, R., Ghosh, S. 2006. Reactive oxygen species level in follicular fluid – embryo quality marker in IVF? *Human Reproduction*. p. 2403–2407. [PubMed: 16861701]
- Dekel, N., Galiani, D., Sherizly, I. 1988. Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 56 (1 – 2). 115 – 121.
- Eckelman, B. P., Salvesen, G. S., Scott, F. L. 2006. Human inhibitor of apoptosis proteins: Why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Reports*. 7 (10): 988 – 994.
- Eichenlaub-Ritter U, Vogt E, Yin H, Gosden R. Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. 2004. *Reproductive BioMedicine Online*. 45–58. [PubMed: 14759287]
- Eichenlaub-Ritter, U., 2012. Oocyte aging and it's cellular basis. *Developmental biology*. Berlin. P. 841-852

- Eppig, J. J., 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. Society of Reproduction and Fertility, Bar Harbor. p. 829-838
- Eppig, J. J., Viveiros, M. M., Bivens, C. M., De la Fuente, K. 2004. Regulation of mammalian oocyte maturation. In: Leung, P.C. K., Adashi, E. Y. (eds.). *The Ovary*. Elsevier. Oxford. p. 113-125.
- Esfandiari N, Falcone T, Agarwal A, Attaran M, Nelson DR, Sharma RK. 2005. Protein supplementation and the incidence of apoptosis and oxidative stress in mouse embryos. *Obstetrics and Gynecology*, 105: 653–660.
- Fair, T., 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal reproduction science*. Elsevier Science B.V. p. 203-216
- Fan, H., Sun, Q., 2003. Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of reproduction*. Society for the study of reproduction. p. 535-547
- Fan, H., Chen, D., Sun, Q., Tong, Ch., 2002. Roles of MAP kinase signaling pathway in oocyte meiosis. *Chinese science bulletin*. Chinese academy of sciences. Beijing. China. p. 1157-1161
- Felici, M. D. Carlo, A. D., Pesce, M., Iona, S., Farrace, M. G., Piacentini, M. 1999. Bcl-2 and Bax regulation of apoptosis in germ cells during prenatal oogenesis in the mouse embryo. *Cell Death and Differentiation*. 6 (9). 908 – 915.
- Fissore, R. A., Kurokawa, M., Knott, J., Zhang, M., Smyth, J. 2002. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction*. 124 (6). 745 – 754.
- Freeman F, Koder Y (1995) Garlic chemistry – stability of S-(-2-propenyl) 2-propene-1-sulfinothiolate (allicin) in blood, solvents, and stimulated physiological fluids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2332-2338.

Gougeon, A., 2004. Dynamics of human follicular growth: morphologic, dynamic and functional aspects. In: Leung, P.C. K., Adashi, E. Y. (eds.). *The Ovary*. Elsevier. Oxford. p. 31-38.

Grøndahl, G. 2008. Oocyte maturation. Basic and clinical aspects of *in vitro* maturation (IVM) with special emphasis of the role of FF-MAS. *Danish Medical Bulletin*. 55 (1). 1 – 16.

Gross, A., McDonnell, J. M., Korsmeyer, S. J. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *GENES & DEVELOPMENT*. 13. 1899–1911.

Guraya, S. S. 2008. Cellular and molecular biology of human oogenesis, ovulation and early embryogenesis: fundamentals, biochemical and clinical implications in relation to infant disorder. New Age International Publisher. New Delhi. India. p. 142.

Guthrie, H. D., Garret, W. M. 2000. Factors regulating apoptosis during folliculogenesis in pigs. *Journal of Animal Science*. 77. 1–15.

Hassold T, Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics*, 2: 280–291.

Hockenbery, D., Nuñez, G., Milliam, C., Schreiber, R. D., Korsmeyer, S. J. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. 348 (62299). 334 – 336.

Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Fesik, S. W. 1996. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature*. 384 (6610). 638 – 641.

Hussein, M. R. 2005. Apoptosis ovary: Molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*. 11 (2). 162 – 178.

Chaube, S. K., Kumar, P. K.V., Tripathi, A. 2010. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocyte. *Journal of cellular physiology*. Varanasi. p. 592-598

- Choi WJ, Banerjee J, Falcone T, *et al.* Oxidative stress and tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. *Fertility and Sterility*. 2007; 88:1220–1231. [PubMed: 17601599]
- Iciek, M., Kwiecien, I. and Wlodek, L. (2009) Biological Properties of Garlic and Garlic-Derived Organosulfur Compounds. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50, 247-265.
- Inoue, M., Naito, K., Aoki, F., Sato, E. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote*. 3 (3). 265 – 271.
- Irniger, S. 2006. Preventing fatal destruction: Inhibitor of the anaphase-promoting complex in meiosis. *Cell Cycle*. 5 (4). 405 – 415.
- Jagarlamudi, K., Rajkovic, A., 2011. Oogenesis: Transcriptional regulators and mouse models. *Molecular and cellular endocrinology*. Pittsburgh. p. 31-39
- Jin, Z., El-Deiry, W. S. 2005. Overview of cell death signaling pathway. *Cancer Biology and Therapy*. 4 (2). 139 – 163.
- 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.
- Kelekar, A., Thompson, C. B. 1998. Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends in Cell Biology*. 8 (8). 324 – 330.
- Kelly, P. N., Strasser, A. 2011. The role Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death and Differentiation*. 18 (9). 1414 -1424
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 26 (4). 239 – 257.
- Kirkin, V., Joos, S., Zörnig, M. 2004. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biocimica et biophysica Acta*. 1644 (2-3). 229 – 249.

- Kishimoto, T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Cell Biology*. 15. 654–663.
- Kodaman, P. H., Behrman, H. R. 2001. Endocrine-regulated and protein kinase C-dependent generation of superoxide by rat preovulatory follicles. *Endocrinology*. p. 687–693. [PubMed: 11159840]
- Koopman, G., Reuterlingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., Van Oers, M. H. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cell undergoing apoptosis. *Blood*. 84 (5). 1415 – 1420.
- 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. 33–43.
- Kroemer, G. 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Medicine*. 3. 614– 20.
- Lanzotti V. 2006. The analysis of onion and garlic. *J Chromatogr A* 1112:3–22.
- Luberda, Z. 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reproductive Biology*. 5:5–17.[PubMed: 15821775]
- Luciano A.M., Lodde V., Beretta M.S., Colleoni S., Lauria A., Modena S. (2005) Developmental capability of denuded bovine oocyte in a coculture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3,5-monophosphate, and glutathione. *Molecular Reproduction and Development*, 71: 389–397.
- Mancini, M., Nicholson, D. W., Roy, S., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Casciola-Rosen, L. A., Rosen, A. 1998. The Caspase-3 Precursor Has a Cytosolic and Mitochondrial Distribution: Implications for Apoptotic Signaling. *The Journal of Cell Biology*. 140 (6). 1485–1495.
- Masui, Y., Clarke, H. J. 1979. Oocyte maturation. *International Review of Cytology*. 57. 185 – 282.

Matsuda-Minehata, F., Inoue, N., Goto, Y., Manabe, N. 2006. The Regulation of Ovarian Granulosa Cell Death by Pro- and Anti-apoptotic Molecules. *Journal of Reproduction and Development*. 52 (6). 695–705.

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

Morita, Y., Tilly, J. L. 1999. Oocyte apoptosis: Like sand through an hourglass. *Developmental Biology*. 213 (1). 1 – 17.

Mustafa AK, Gadalla MM, Snyder SH (2009) Signalling by gasotransmitters. *Science Signaling*, 2: doi: 10.1126/scisignal.268re2.

Nagata, S. 1997. Apoptosis by Death Factor. *Cell*. 88. 355–365.

Nakagawa S, Kasuga S, Matsuura H (1988) Prevention of liver damage by aged garlic extract and its constituents in mice. *Phytother Research*, 1: 1–4.

Otto, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 913–922. [PubMed: 17453160]

Pasqualotto, E. B., Agarwal, A., Sharma, R. K. 2004. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertility and Sterility*. p. 973–976. [PubMed:15066450]

Pepling, M. 2013. Oocyte development before and during folliculogenesis. In: Krisher, R. L. (eds.), *Oocyte physiology and development in domestic animals*. John Wiley & Sons. Oxford. p. 1-9.

Petros, A. M., E. T. Olejniczak a S. W. Fesik (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1644(2-3): 83-94.



Pinto, J. T., Krasnikov, B. F. and Coopert, A. J. L. (2006) Redox-sensitive proteins are potential targets of garlic-derived mercaptocysteine derivatives. *Journal of Nutrition*, 136, 835S-841S.

Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F., Chiarotto, E. 2004. Oxidative stress and cell signalling. *Current Medicinal Chemistry*. p. 1163–1182. [PubMed: 15134513]

Rabinkov, A., Miron, T., Mirelman, D., Wilchek, M., Glozman, S., Yavin, E. and 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.

Romanovský, A., Činčerová, A., Čížek, F., Dvořák, P., Kaprálek, F., Kubišta, V., Nedvídek, J., Opatrný, Z., Pazourek, J., Pikálek, P., Seifert, J., Slavíková, Z., Váňa, J., Závada, V. 1988. *Obecná biologie*. Státní pedagogické nakladatelství Praha. Praha. p. 695. ISBN: 1437088.

Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., Reed, J. C. 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins sre direct inhibitors of specific caspases. *The EMBO Journal*. 16 (23). 6914 – 6925.

Sabatini, L., Wilson, C., Lower, A. 1999. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in-vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. p. 1027–1034. [PubMed: 10593376]

Saran, S. 2000. Programmed cell death. *Current Science*. 78 (5). 575 – 586.

Scaffidy, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., Peter, M. E. 1998. Two CD95 (APO/Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal*. 17 (6). 1675 – 1687.

Setiadi, M. A. 1998. Effect of Different Maturation Media on Nuclear and Cytoplasmic Maturation of Porcine Oocytes *in Vitro*. PhD thesis. Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule. Hannover. p. 141.

- Shimaoka, T., Nishimura, T., Kano, K., Naito, K. 2011. Analyses of the Regulatory Mechanism of Porcine WEE1B: The Phosphorylation Sites of Porcine WEE1B and Mouse WEE1B Are Different. *Journal of Reproduction and Development*. 57 (2). 223–228.
- Stoll A, Seebeck E (1948) Allium compounds. I. Alliin the true mother compound of garlic oil. *Helvetica Chimica Acta*, 31: 189–210.
- Tanghe S, Van Soom A, Mehrzad J, Maes D, Duchateau L, de Kruif A (2003) Cumulus contributions during bovine fertilization *in vitro*. *Theriogenology*, 60: 135–149.
- Tilly, J. L. 1996. Apoptosis and ovarian function. *Review of Reproduction*. 1 (3). 162 – 172.
- Tunguist, B. J., Maller, J. L. 2003. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes and Development*. 17 (6). 683 – 710.
- 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
- Van den Hurk, R., Zhao, J., 2004. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. p. 1717-1751
- Whitaker, M., 1996. Control of meiotic arrest. *Reviews of reproduction*. 1(2). p. 127-135
- Zhang, X., Li, X. H., Ma. X. 2006b. Redox-induced apoptosis of human oocytes in resting follicles *in vitro*. *Journal of the Society of Gynecologic Investigation*. 13:451–458.
- Yamasaki T, Li L, Lau BHS (1994) Garlic compounds protect vascular endothelial-cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury. *Phytotherapy Research*, 8: 408-412.
- Yi YJ, Sutovsky M, Song WH, Sutovsky P. Protein deubiquitination during oocyte maturation influences sperm function during fertilisation, antipolyspermy defense and embryo development. *Reprod Fertil Dev*. 2014 May 22. doi: 10.1071/RD14012. [Epub ahead of print]

Youle, R. J., Strasser, A. 2008. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews : Molecular Cell Biology*. 9 (1). 47 – 49.