

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Vliv sirných sloučenin česneku na oxidativní stres
prasečích oocytů v průběhu meiotického zrání v *in vitro*
podmínkách**

Diplomová práce

Autor práce: Anna Holendová

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

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv sirných sloučenin česneku na oxidativní stres prasečích oocytů v průběhu meiotického zrání v *in vitro* podmínkách" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Janu Nevoralovi, Ph.D. za trpělivé vedení a cenné rady v průběhu vypracovávání diplomové práce a Ing. Markétě Dvořákové za pomoc při získání a zpracování výsledků.

Zvláštní poděkování bych chtěla také věnovat svým rodičům, kteří mají svou materiální i duchovní podporou nemalý podíl na vzniku této diplomové práce.

Vliv sirných sloučenin česneku na oxidativní stres prasečích oocytů v průběhu meiotického zrání v *in vitro* podmínkách

Souhrn

Oogeneze je proces vývoje a vzniku oocytu zahrnující stádium množení, růstu a zrání. Stádium zrání je charakteristické jadernými a cytoplazmatickými procesy, které jsou nutné k dosažení vývojové kompetence. Na průběhu meiotického zrání se podílí řada nezbytných regulačních látek. Narušená rovnováha těchto faktorů a jejich aktivity vede k snížení úspěchu meiotického zrání a nabytí vývojové kompetence. Za nežádoucí změny na úrovni regulačních faktorů meiotického zrání je v *in vitro* podmínkách často zodpovědný oxidativní stres.

Oxidativní stres je nežádoucí stav způsobující poškození buněk, ke kterému dochází na základě disbalance antioxidantní ochrany a produkce reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species). Nežádoucí produkci ROS potlačují endogenní a exogenní antioxidanty. Mezi látky s antioxidantní aktivitou patří i sirné sloučeniny česneku, z nichž nejintenzivnější antioxidantní účinky vykazuje S-allylcystein (SAC).

Byla stanovena hypotéza, že sirné sloučeniny česneku ovlivňují produkci ROS při meiotickém zrání *in vitro*. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda lze prokázat vliv SAC na jaderné zrání oocytů a přítomnost markerů oxidativního stresu v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách.

Získané výsledky prokázaly, že SAC nemá vliv na průběh jaderného zrání po kultivaci 24 hodin a 48 hodin ve třech různých koncentracích (0,1; 0,5; 1 mM SAC). Bylo však dokázáno, že SAC ovlivňuje produkci ROS v průběhu zrání *in vitro* u oocytů ve stádiu metafáze I a metafáze II, kdy byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi oocyty kontrolní skupiny a experimentálními skupinami oocytů kultivovaných s SAC. Všechny použité koncentrace SAC způsobily snížení produkce ROS. Zároveň byl prokázán vliv SAC na expresi kaspázy 3 při kultivaci za přítomnosti 0,5 mM SAC ve stádiu metafáze I a metafáze II.

Výsledky publikované v této diplomové práci potvrdily hypotézu, že sirné sloučeniny česneku snižují hladiny ROS prasečích oocytů v průběhu meiotického zrání v *in vitro* podmínkách a umožňují tak předejít vzniku oxidativního stresu. Tato skutečnost by mohla v budoucnu přispět k využívání sirných sloučenin česneku jako složky kultivačních médií, používaných pro meiotické zrání oocytů v *in vitro* podmínkách.

Klíčová slova: meiotické zrání, oocyt, oxidativní stres, sirné sloučeniny česneku, S-allylcystein

Effect of garlic sulphur compounds on oxidative stress during meiotic maturation of porcine oocytes in *in vitro* conditions

Summary

Oogenesis is a process of formation and development of oocyte involving phases of mitotic cell division, growth and meiotic maturation. Maturation phase is characteristic with nuclear and cytoplasmatic changes, that are necessary to achieve developmental competence. Meiotic maturation is affected by many indispensable regulating factors. Impaired balance among these factors and their activity leads to decreased success of meiotic maturation and developmental competence acquisition. Undesirable changes on the level of regulation factors during *in vitro* conditions are often caused by oxidative stress.

Oxidative stress is a state resulting to cell damage and it is caused by disbalance between antioxidants and production of reactive oxygen species (ROS). Production of ROS is influenced by endogenous and exogenous antioxidants. Garlic sulphur compounds are substances with antioxidative activity and S-allylcysteine (SAC) seems to be the most active among them.

Hypothesis was formulated, that garlic sulphur compounds affect production of ROS during meiotic maturation *in vitro*. The aim of this thesis was to find out a possible effect of SAC on nuclear maturation and presence of oxidative stress markers during meiotic maturation of porcine oocytes in *in vitro* conditions.

The results showed, that SAC has no effect on nuclear maturation after 24 and 48 hours cultivation in three different concentrations of SAC (0,1; 0,5; 1 mM SAC). On the other hand, SAC affects production of ROS in oocyte during maturation *in vitro* in metaphase I and metaphase II where was statistically significant difference between oocytes of control group and oocytes of experimental group cultivated with SAC. Every applied concentration of SAC led to reduction of ROS production. Effect of 0,5 mM SAC on cleaved caspase 3 expression has been proved in oocytes in metaphase I and metaphase II.

Results presented in this thesis confirmed the hypothesis, that garlic sulphur compounds reduce levels of ROS in porcine oocytes during meiotic maturation in *in vitro* conditions and help to prevent formation of oxidative stress. This fact could contribute to the use of garlic sulphur compounds as a component of culture media used for meiotic maturation *in vitro*.

Keywords: meiotic maturation, oocyte, oxidative stress, garlic sulphur compounds, S-allylcysteine

Obsah

1	Úvod	1
2	Hypotéza a cíle práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Oogeneze a folikulogeneze	3
3.1.1	Stádium množení	3
3.1.2	Stádium růstu oocyty a folikulogeneze	4
3.1.3	Meiotické zrání oocyty	7
3.2	Regulace meiotického zrání a aktivace oocyty	10
3.2.1	Regulace meiotického zrání	10
3.2.2	Aktivace oocyty.....	13
3.3	Oxidativní stres	15
3.3.1	Vznik oxidativního stresu.....	15
3.3.2	Dopad oxidativního stresu na organismus.....	17
3.3.3	Dopad oxidativního stresu na reprodukční funkce	18
3.4	Sírné sloučeniny česneku	19
3.4.1	Vznik a metabolismus sírných sloučenin česneku	19
3.4.2	Antioxidativní účinky sírných sloučenin česneku	20
4	Materiál a metodika	23
4.1	Aspirace a kultivace prasečích oocytů	23
4.1.1	Hodnocení vlivu sírných sloučenin česneku na jaderné zrání.....	23
4.1.2	Určení produkce reaktivních forem kyslíku	24
4.1.3	Imunocytochemická analýza	24
4.2	Analýza obrazu.....	25
4.3	Statistická analýza	25
5	Výsledky	26
5.1	Vliv SAC na jaderné zrání prasečích oocytů <i>in vitro</i>	26
5.1.1	Hodnocení stádia jaderného zrání oocytů po 24 hodinách kultivace	26
5.1.2	Hodnocení stádia jaderného zrání oocytů po 48 hodinách kultivace	27

5.2	Vliv SAC na produkci ROS v průběhu meiotického zrání <i>in vitro</i>	29
5.2.1	Hodnocení intenzity signálu ROS u oocytů ve stádiu metafáze I	29
5.2.2	Hodnocení intenzity signálu ROS u oocytů ve stádiu metafáze II	31
5.3	Hodnocení exprese kaspázy 3	32
5.3.1	Hodnocení exprese kaspázy 3 u oocytů ve stádiu metafáze I	33
5.3.2	Hodnocení exprese kaspázy 3 u oocytů ve stádiu metafáze II	33
6	Diskuze	35
7	Závěr	38
8	Seznam literatury	39

1 Úvod

V posledních letech dochází k prudkému rozvoji reprodukčních biotechnologií. Jedním z hlavních důvodů této skutečnosti je bezpochyby stále narůstající procento lidské neplodnosti. Své uplatnění však reprodukční biotechnologie nalézají také ve veterinární praxi, kde napomáhají produktivitě živočišné výroby a šlechtitelskému procesu.

Nedílnou součástí reprodukčních biotechnologií je práce s pohlavními buňkami. Proces oogeneze, tedy vzniku a vývoje samičí pohlavní buňky - oocyty, je velmi náročným a komplexním dějem, který probíhá po celou dobu reprodukčně aktivního života samice. Je započat již v období embryonálního vývoje a jeho součástí je řada důležitých událostí, jejichž výsledkem je plnohodnotná pohlavní buňka, která je základem vzniku nového jedince.

Klíčovým procesem, kterým se reprodukční biotechnologie zabývají, je zejména proces meiotického zrání, kdy dochází k nabývání vývojové kompetence oocyty. Průběh meiotického zrání se může významným způsobem odrazit na výsledné kvalitě embrya. Průběh zrání oocyty může negativně ovlivnit i nadměrná produkce reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species), se kterou se setkáváme při *in vitro* zrání oocytů. ROS jsou faktorem, jenž při nadměrné produkci způsobuje vznik stavu zvaného oxidativní stres. Oxidativní stres může vyústit v nevratné poškození pohlavní buňky. Hlavním cílem řady vědeckých týmů je tento negativní vliv eliminovat.

Sírné sloučeniny česneku jsou bioaktivní látky, které v organismu napomáhají redukcí ROS a tím ochraňují buňky před vznikem oxidativního stresu. Pozitivní vliv sírných sloučenin česneku na buňky živého organismu spočívá zejména v jejich schopnosti vychytávat ROS, zabraňovat peroxidaci lipidů a zvyšovat aktivitu přirozených buněčných antioxidantů. Antioxidativní efekt těchto sloučenin může ovlivnit i proces meiotického zrání oocytů a výrazně tak zefektivnit reprodukční biotechnologie.

2 Hypotéza a cíle práce

Byla stanovena hypotéza, že sirné sloučeniny česneku inhibují vznik oxidativního stresu v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách a ovlivňují tak výsledky tohoto procesu.

Pro ověření výše formulované hypotézy byly stanoveny tyto cíle:

- ověřit vliv S-allylcysteinu (SAC) na průběh jaderného zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách,
- zhodnotit vliv SAC na produkci reaktivních forem kyslíku v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách,
- zhodnotit vliv SAC na expresi markeru časné apoptózy oocytu – štěpené formy kaspázy 3 v průběhu *in vitro* zrání.

3 Literární rešerše

3.1 Oogeneze a folikulogeneze

Oogeneze je proces vzniku a následného vývoje samičích pohlavních buněk – oocytů do oplození schopného stavu. Tento proces zahrnuje jak vývoj primordiálních zárodečných buněk, tak formování ogonií, jejich množení, růst oocyty a získání meiotické kompetence, zrání a získání vývojové kompetence. Počátek oogeneze je charakteristický již pro fázi embryonálního vývoje a probíhá až do doby ukončení reprodukčního období samice, klimakteria, kdy dochází k postupnému útlumu reprodukčních funkcí včetně samotné oogeneze. S procesem oogeneze je neoddelitelně spjat i proces folikulogeneze, zahrnující vznik a vývoj funkční struktury obsahující oocyt – ovariálního folikulu.

3.1.1 Stádium množení

3.1.1.1 Formování primordiálních zárodečných buněk

Samičí i samčí pohlavní buňky se zakládají ve stejném, zpočátku indiferentním základu – tzv. primordiálních zárodečných buňkách (PGCs – primordial germ cells). PGCs jsou prekurzorové buňky oocytů extragonadálního původu (Wassarman *et* Albertini, 1994), které se diferencují v časně fázi ontogeneze, ještě v presomitovém období vývoje embrya. Shluky PGCs lze nalézt již u velmi raného, sedmidenního savčího embrya v oblasti extra – embryonálního mezodermu a teprve později jsou PGCs zabudovány do embrya – nejprve do mezodermu primitivního váčku a posléze do endodermu (Ginsburg *et al.*, 1990).

PGCs jsou snadno odlišitelné od okolních buněk zejména díky cytoplazmě bohaté na glykogen a charakteristicky vysoké aktivitě alkalické fosfatázy (Chiquoine, 1954). PGCs jsou charakteristické svou intenzivní mitotickou aktivitou. Počty PGCs u savčích embryí rapidně vzrůstají, u prasečího embrya je možné pozorovat nárůst z 5 000 PGCs ve 20 dnech březosti na 1 100 000 PGCs v 50 dnech březosti (Hunter, 2000).

Vzhledem ke skutečnosti, že PGCs vznikají vzdáleně od místa, kde dochází k vývoji gonád, je nutný jejich přesun. Migrace PGCs závisí na lokální produkci cytokinů, zahrnujících kit-ligand a transformující růstový faktor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$ – transforming growth factor $\beta 1$) (Gosden, 1995). Migrace probíhá aktivní a pasivní cestou. Pasivně probíhá zejména zabudování PGCs do prvostřeva. Buňky raného savčího embrya mají kulovitou – nemotilní strukturu. Po osídlení prvostřeva dochází k náhodnému roztroušení buněk. Po zabudování do prvostřeva zárodku získávají PGCs schopnost pohybu, mění svůj tvar a vytváří pseudopodie,

kteře umožňují aktivní migraci do vznikajících genitálních lišt (Fujimoto *et al.*, 1977). Tato druhotná migrace byla detekována u myších embryí v období kolem 9. dne březosti (Molyneaux *et Wylie*, 2004) a u prasete v období kolem 30. dne březosti (Romanovský *et al.*, 1988).

PGCs jsou v tomto období naváděny chemoatraktanty, které produkují buňky genitálních lišt. Po zabudování buněk do genitálních lišt dochází k programované buněčné smrti buněk nacházejících se ve středním regionu lišty, jejímž důsledkem je diferenciacce buněk. Vcestování PGCs do genitální lišty je podmínkou pro zahájení vývoje gonád (Molyneux *et Wylie*, 2004).

3.1.1.2 Diferenciacce PGCs v oogonie a vznik primárních oocytů

Po osídlení genitálních lišt primordiální buňky ztrácejí schopnost motility a diferencují v oogonie (Gosden *et Bownes*, 1995). Při mitotickém dělení dochází k seskupování oogonií do skupin, tzv. klastrů, jež jsou ohraničeny epiteliálními buňkami coelomu (Sadler, 2011). Zpočátku jsou oogonie spojeny mezibuněčnými můstky. Postupem času oogonie tyto struktury ztrácejí, epitel prorůstá, obaluje samostatné oogonie a vytváří jednovrstevnou funkční strukturu obsahující oocyt, která se nazývá primordiální folikul. Primordiální folikul je tvořen jednou vrstvou plochých, pregranulózních buněk (Picton *et al.*, 1998).

V okamžiku, kdy je buňka ohraničena primordiálním folikulem, zastaví se její mitotické množení a změní se v primární oocyt (Sadler, 2011). Oocyty v tomto období dosahují svého maximálního množství – u prasničky 1 200 000, u člověka až 7 000 000 (Van den Hurk *et Zhao*, 2005). V tomto stádiu však dochází k apoptóze, při níž dojde k buněčné smrti většiny oocytů a zůstanou pouze buňky umístěné v korové oblasti vaječníku. Počet oocytů se tak výrazně zredukuje. Uvádí se, že u prasniček dochází k redukci až o 60 % (Guthrie *et Garrett*, 2001).

3.1.2 Stádium růstu oocytu a folikulogeneze

Růstové stádium oogeneze je charakteristické zvětšováním objemu buňky, které je nezbytné pro vznik meioticky kompetentního oocytu, zrání jádra, oplození a následný embryonální vývoj. V průběhu růstové fáze prasečí oocyt zvětší svůj objem v průměru z 30 μm na 120 μm (Motlik *et Fulka*, 1986).

Primární oocyty vstupují do profáze prvního meiotického dělení. Oocyt prochází celkem 4 stádii profáze I, a sice stádii leptotenním, zygotenním a pachytenním (Picton *et al.*, 1998). Poté je meióza zastavena ve stádiu diplotenním, jinak nazývaném také jako diktyotenní (Wassarman *et Albertini*, 1994). Toto stádium je charakteristické rozptýlenými,

dekondenzovanými a transkripčně aktivními chromozomy, které jsou obklopeny zvětšenou jadernou membránou, jež se nazývá zárodečný váček (GV – germinal vesicle) (Voronina *et* Wessel, 2003). Proces zastavení meiotického dělení v profázi I je označován jako první meiotický blok a dochází k němu přibližně v období před nebo krátce po narození samice (Dekel, 1995).

Na regulaci prvního meiotického bloku se významným způsobem podílí buňky folikulu, které produkují inhibiční faktory (OMI – oocyte maturation inhibitors). Tento fakt naznačuje skutečnost, že již samotné vyjmutí oocyty z folikulu způsobí spontánní obnovení prvního meiotického dělení (Pincus *et* Enzmann, 1935).

Mezi tyto faktory patří zejména cyklický adenosinmonofosfát (cAMP – cyclic adenosin monophosphate) a jeho hladiny uvnitř oocyty (Conti *et al.* 2002), které udržují koncentrace cAMP dependentní protein kinázy A (PKA – protein kinase A) na vysokých úrovních. PKA způsobuje fosforylaci serinu 287 na fosfatáze CDC25 (cell division cycle 25) a udržuje ji tak v inaktivním stavu, kterým se podílí na udržení prvního meiotického bloku (Kishimoto, 2003). Protein kináza MYT1 (myelin transcription factor 1) se podobně jako PKA podílí prostřednictvím fosforylace na inaktivaci CDC25 a zabraňuje znovuzahájení meiózy (Mehlmann, 2005).

Oocyt ve stádiu diplotene má větší objem než oogonie, obsahuje více cytoplazmatických organel. Již proběhl crossing-over mezi deoxyribonukleovými kyselinami (DNA – deoxyribonucleic acid) mateřského a otcovského původu (Van den Hurk *et* Zhao, 2005).

Rostoucí oocyt ve stádiu diplotene je transkripčně aktivní (Voronina *et* Wessel, 2003). Toto období je charakteristické intenzivní proteosyntézou a hromaděním polypeptidů a mRNA, která je akumulována pro pozdější využití. Některé nově syntetizované proteiny jsou využity pro diferenciaci samotného oocyty, jiné vytvářejí spojení s okolními somatickými buňkami nebo jsou využity jako materiál pro formování *zony pellucidy*. Se zvyšujícím objemem buňky dochází k akumulaci vody, iontů a lipidů (Picton *et al.*, 1998).

U již přítomných organel oocyty dochází k jejich modifikaci a redistribuci (Picton *et al.*, 1998). Narůstá počet mitochondrií a ribozomů. Mitochondrie se stávají vakuolizované, mají klenuté krysty (Wassarman *et* Josefowicz, 1978) a přesouvají se na periferní část oocyty (Fair, 2003). Ribozómy dosahují počtu v řádech milionů a objevují se polyribozómy (Wassarman *et* Albertini, 1994).

Golgiho aparát se zvětšuje a mění na velké cisterny, které mají za úkol transport glykoproteinů pro tvorbu *zony pellucidy*, obklopující plně dorostlý oocyt (Mehlmann *et al.*,

1995), a tvorbu kortikálních granulí nutných pro oplození. Zároveň dochází k přemístění Golgiho aparátu na periferii oocyty. S růstem oocyty dochází také ke zmnožování pórů v membráně jádra – zárodečného váčku (GV – germinal vesicle) (Fair, 2003).

Současně s procesem růstu oocyty dochází k vývoji folikulu – folikulogenezi. Folikul je tvořen folikulárními buňkami, které postupně prolifерují a vytvářejí vícevrstevnou strukturu. S vytvářením dutiny folikulu – antra, dochází k rozdělení folikulárních buněk na buňky kumulární, které těsně obklopují oocyt a vytváří strukturu zvanou *cumulus oophorus*, a buňky granulózní nebo murální, které těsně přiléhají ke stěně folikulu (Voronina *et* Wessel, 2003).

Primordiální folikuly zůstávají v klidovém stádiu až do období, kdy dochází k jejich rekrutmentu do rostoucí skupiny. Tato klidová perioda se odvíjí od živočišného druhu samice v závislosti na období pohlavního dospívání. V okamžiku, kdy ploché buňky primordiálního folikulu začnou měnit svůj tvar v kubický, primordiální folikul diferencuje ve folikul primární (Van den Hurk *et* Zhao, 2005). Přeměna folikulu primordiálního v primární je spojena s dosažením pohlavní dospělosti samice a vede k dalšímu vývoji folikulu ve folikul sekundární nebo také preantrální. Sekundární folikul vzniká, když oocyt vstupuje do intenzivní růstové fáze. Okolní granulózní buňky se začínají výrazně množit a dochází k vzniku dvou a více vrstevného folikulu (Van den Hurk *et al.*, 1997).

Kolem vrstvy granulózních buněk sekundárního folikulu se vytváří thekální vrstva tvořená buňkami stromatu vaječníku. Tato vrstva se s růstem folikulu postupně diferencuje ve vnější *theca folliculi externa* a vnitřní *theca folliculi interna* (Sadler, 2011). V této fázi vývoje začíná být folikul vnímavý na gonadotropiny a exprimuje receptory pro folikulostimulující hormon (FSH – follicle stimulating hormone) a luteinizační hormon (LH – luteinizing hormone) (Fair, 2003). U prasnic dosahuje sekundární folikul maximální velikosti 300 μm , přičemž oocyt v něm umístěný velikosti 90 μm (Van den Hurk *et al.*, 1997). Přibližně ve fázi vzniku sekundárního oocyty dochází k utváření významné vrstvy na povrchu oocyty – *zona pellucida*.

Zona pellucida je glykoproteinový obal o šířce do 15 μm (Cohen *et al.*, 1992), vytvářející ochranný plášť, znemožňující transport molekul větších než 170 kDa (Picton *et al.*, 1998) a oddělující vajíčko od vrstvy granulózních buněk (Takagi *et al.*, 1989).

Komunikace mezi vajíčkem a granulózními buňkami je však nadále zajištěna vznikajícími spoji typu gap junction, které umožňují oboustranný přesun nezbytných látek, mezi něž patří například živiny a signální molekuly (Anderson *et* Albertini, 1976). Spojení typu gap junction jsou vytvářeny proteiny konexiny jež jsou tvořeny po celé období folikulogeneze (McGhee *et* Hsueh, 2000). U rostoucích a zralých savčích oocytů byly nalezeny konexiny 32,

37, 43, 45 a 57 (Wright *et al.*, 2001). Jednotlivé typy konexinů jsou vytvářeny v závislosti na fázi folikulogeneze (Fair, 2003).

Zona pellucida je tvořena třemi zonálními glykoproteiny – ZP1, ZP2 a ZP3. Zonální glykoproteiny jsou důležité pro správný vývoj folikulů, udržení strukturální integrity a nezbytně nutné pro proces fertilizace (Soyal *et al.*, 2000). Funkce zonálních glykoproteinů jsou odlišné v závislosti na jejich biologických úlohách. ZP1 má funkci jako spojovací článek mezi ZP2 a ZP3. ZP3 působí jako receptor, který váže hlavičku spermie a spouští akrozomální reakci. ZP2 vytváří sekundární receptor spermie, umožňující její proniknutí *zonou pellucidou* (Wassarman, 1988).

V průběhu dalšího folikulárního vývoje dochází k vaskularizaci a zvýšení propustnosti cév folikulu a k růstu folikulu. Důsledkem toho mezi folikulárními buňkami vzniká antrum - dutina vyplněná tekutinou, která slouží oocytu jako zdroj nezbytných látek pro výživu a regulaci zrání (Van den Hurk *et Zhao*, 2005). Takový folikul je označován jako terciální, antrální anebo Graafův. Oocyt obvykle ukončí velkou část svého růstu ještě před zformováním antrální dutiny folikulu a v průběhu růstu antrálního folikulu dochází již jen k velmi nepatrnému zvětšování objemu oocytu (Eppig, 2001).

V důsledku formování antrální dutiny dochází k oddělení folikulárních buněk na dva separované oddíly – vnější murální granulózní buňky formující vnější vrstvu a kumulární buňky obklopující oocyt (Mehlmann, 2005).

Folikulární antrum zpočátku nabývá srpkovitého tvaru, s jeho rozšiřováním a zvětšováním dochází k zatlačování oocytu na periferii folikulu (Sadler, 2011). V období vzniku antrálního folikulu nabývá oocyt meiotické kompetence (Erickson *et Sorensen*, 1974). Meiotická kompetence je charakterizována jako schopnost podstoupit a dokončit meiotické dělení.

3.1.3 Meiotické zrání oocytu

Období zrání oocytu je charakteristické vystoupením oocytu z prvního meiotického bloku, znovuzahájením a dokončením prvního meiotického dělení a zahájením druhého meiotického dělení. Tento proces může podstoupit pouze oocyt, který již dosáhl takové velikosti, kdy může být označen jako meioticky kompetentní a je umístěn v preovulačním dominantním folikulu (Van den Hurk *et Zhao*, 2005). U prasnic dochází k získání meiotické kompetence při velikosti folikulu 3 mm a více (Marchal *et al.*, 2002), přičemž oocyt v takovém folikulu dosahuje velikosti přibližně 120-125 μm (Picton *et al.*, 1998).

Iniciačním stimulem pro obnovení meiózy oocyty je preovulační vlna LH, ke které dochází v období pohlavní dospělosti samice. Před obnovením meiózy je oocyt obklopen kompaktní vrstvou kumulárních buněk. Kumulární buňky prostřednictvím spojů typu gap junctions zajišťují obousměrnou komunikaci a molekulární signalizaci mezi cytoplazmatickou membránou oocyty - oolemou a kumulárními buňkami (Wassarman *et* Albertini, 1994).

Vlivem produkce kyseliny hyaluronové (HA – hyaluronic acid) kumulárními buňkami jako odpovědi na vlnu LH, dochází k mucifikaci a jevu zvanému expanze kumulárních buněk. Důsledkem kumulární expanze je přerušení spojů gap junctions a redukce faktorů udržujících první meiotický blok (Picton *et al.*, 1998). Tato eliminace způsobuje aktivaci látek, jako jsou cykliny, fosfatázy a kinázy, které jsou nezbytné pro meiotické zrání (Hunter, 2000).

Fáze meiotického zrání oocyty probíhá v době mezi LH vlnou a ovulací a je rozdělena na jaderné zrání a zrání cytoplazmy (Voronina *et* Wessel, 2003).

3.1.3.1 Jaderné zrání

Jaderné zrání oocyty zahrnuje události, jejichž výsledkem je vydělení prvního pólového tělíska do perivitellinního prostoru a vstoupení oocyty do metafáze II. Před vystoupením z prvního meiotického bloku se oocyt nachází ve stádiu zárodečného váčku (GV – germinal vesicle) (Wassarman *et* Albertini, 1994). Toto stádium je odpovídající G₂ fázi buněčného cyklu somatických buněk. Chromozomy plně dorostlého oocyty jsou v GV z převážné většiny dekonzenzované, rozptýlené (Dekel, 1995), ale transkripčně inaktivní (Voronina *et* Wessel, 2003).

Se znovuzahájením meiotického dělení začíná chromatin GV kondenzovat a dochází k procesu zvanému rozpad zárodečného váčku (GVBD – germinal vesicle breakdown). Proces GVBD je u prasety rozdělen do 5 fází (GV 0, GV I, GV II, GV III, GV IV). GV 0 je stádium charakteristické jaderným a vláknitým chromatinem rozptýleným v neporušeném jádře. Ve stádiu GV I je jádérko výrazné a chromatin jej obklopuje a vytváří strukturu podobnou podkově. GV II je typické přetrvávající podkovovitou strukturou chromatinu, začínají se však vytvářet shluky chromatinu na jaderné membráně. V následující fázi GV III je chromatin již plně zkondenzovaný, jádro a jádérko je však stále viditelné. Nakonec ve stádiu GV IV dochází k rozpuštění jaderné membrány a jádérka (Lucas *et al.*, 2002). Proces GVBD trvá u prasety přibližně 24 hodin (Wehrend *et* Meinecke, 1998).

Spárované homologní dvojice chromozomů se přesouvají do ekvatoriální roviny oocyty a vytváří se dělicí vřetenko. Následuje navázání vřetenka na chromozomy a jejich segregace, která je následována vydělením prvního pólového tělíska, kterým se primární oocyt mění na

oocyt sekundární. Oocyt vstupuje ihned do metafáze druhého meiotického dělení za absence S-fáze. Chromozómy jsou opětovně navázány na dělicí vřeténko oocytu. V této fázi dochází k druhému meiotickému bloku (Voronina *et* Wessel, 2003), ve kterém oocyt zůstává do období oplození nebo partenogenetické aktivace. U prasnic probíhá období jaderného zrání přibližně 44 hodin (Motlik *et* Fulka, 1976).

3.1.3.2 Cytoplazmatické zrání

Zrání cytoplazmy oocytu – ooplazmy, je nezbytně nutným procesem pro vznik kvalitního a zralého, oplození schopného - vývojově kompetentního oocytu. Biochemické procesy v ooplazmě regulují zmíněné změny chromatinu. Úkolem zrání cytoplazmy je zejména zajistit takové podmínky uvnitř oocytu, které, pokud dojde k oplození, zabrání vzniku polyspermie, umožní dekonduzaci spermie po jejím vniknutí do oocytu a zajistí formování prvojader. V průběhu zrání oocytů *in vitro* může být proces zrání cytoplazmy narušen. Oocyt s narušeným zráním cytoplazmy není plně vývojově kompetentní a obvykle se projevuje chybami při formování samčího prvojádra a sníženou schopností vývoje do fáze blastocysty (Niwa, 1993). Proces zrání zahrnuje morfologické změny organel i jejich redistribuci (Van den Hurk *et* Zhao, 2005).

Mitochondrie v průběhu zrání cytoplazmy nepodstupují dramatické strukturální změny (Van den Hurk *et* Zhao, 2005), dochází však k jejich přemísťování. Mitochondrie se po iniciaci zrání přesouvají z periferní pozice blíže do středu buňky a seskupují se kolem GV do míst s vysokou potřebou energie (Stojkovic *et al.*, 2001). V okamžiku vydělení prvního pólového tělíska se mitochondrie opět rozptýlí a v metafázi II se opět seskupují v okolí jádra buňky (Van Blerkom *et* Runner, 1984). Dochází k nárůstu množství mitochondrií – u primárních oocytů se vyskytuje v průměru 6 000 kopií mitochondriální DNA (mtDNA – mitochondrial DNA) a v průběhu zrání se toto množství zvyšuje na více než 100 000 kopií mtDNA, přičemž na jednu organelu připadá 1-2 kopie mtDNA (Shoubridge *et* Wai, 2007). Do středu buňky a blízkosti GV se také přesouvá Golgiho aparát, který kolem GV vytváří kruh (Thibault *et al.*, 1987).

Redistribuci v průběhu meiotického zrání vykazují četná granula, která jsou akumulována v oocytu v průběhu cytoplazmatického zrání, a to zejména granula žlutková, pigmentová a kortikální. Tyto útvary, především kortikální granula, jsou během zrání přesouvány na periferii oocytu do blízkosti cytoplazmatické membrány (Voronina *et* Wessel, 2003). Přesun kortikálních granul hraje důležitou roli v pozdější exocytóze (kortikální reakci) při oplození a prevenci polyspermie (Voronine *et* Wessel, 2003). Kortikální granula jsou

útvary typické pro oocyty a skládají se z různých populací proteinů, enzymů, glykosaminoglykanů a strukturálních molekul (Ferreira *et al.*, 2009).

Cytoplazmatické změny v průběhu meiotického zrání se týkají i cytoskeletárních komponent. Redistribuce organel je úzce spjata s dynamikou mikrofilament, které začínají formovat síť, jež umožňuje přesun organel. Mikrotubuly v kortexu buňky jsou z prodloužených struktur, charakteristických pro rostoucí oocyt, rozebrány a formují dělicí vřeténko (Voronina *et Wessel*, 2003).

3.2 Regulace meiotického zrání a aktivace oocyty

K obnovení prvního meiotického dělení dochází v pubertě s nástupem estrálního cyklu samice. Jak již bylo naznačeno výše, na vystoupení oocyty z prvního meiotického bloku se významným způsobem podílí preovulační vlna LH. LH působí na murální buňky folikulu, na kterých jsou umístěny receptory pro LH. Tento signál musí být následně transportován přes mezibuněčné spoje typu gap junction do oocyty, neboť oocyt neexprimuje receptory pro gonadotropní hormony (Peng *et al.*, 1991).

Granulózní buňky folikulu reagují na LH vlnu produkcí progesteronu, který nahradí doposud převládající estrogen a produkcí HA, která se významně podílí na expanzi kumulárních buněk. Expanzí kumulárních buněk dochází k přerušení spojů gap junction (Picton *et al.*, 1998).

Protože udržení meiotického bloku je závislé na prostředí folikulu a rozvinutou obousměrnou komunikací mezi oocytem a kumulárními buňkami, toto přerušení vede k obnovení prvního meiotického dělení.

3.2.1 Regulace meiotického zrání

3.2.1.1 Funkce cAMP

cAMP je produkován kumulárními buňkami a transportován do oocyty přes spoje typu gap junction, které jsou přítomné mezi kumulárními buňkami a oocytem (Shimada *et Terada*, 2002). Při přerušení spojů, ke kterému dochází v důsledku redukce proteinu konexinu 43 ve vnější vrstvě kumulárních buněk (Sun *et Nagai*, 2003) jako odpovědi na proces kumulární expanze, dochází ke snížení hladin cAMP uvnitř oocyty a snížení hladin na cAMP dependentní PKA. Výsledkem je obnovení meiotického dělení (Picton *et al.*, 1998).

Některé studie však uvádí, že oocyt dokáže cAMP syntetizovat sám a to přes G-proteinové receptory, které aktivují Gs protein a stimulují enzym adenylyl cyklázu (AC – adenylyl cyclase), která je klíčová pro syntézu cAMP (Mehlmann, 2005).

Meiotické zrání závisí na fosforylaci a defosforylaci cytoplasmatických faktorů, jako je zejména M-fázi/zrání podporující faktor (MPF – M-phase/maturation promoting factor) a cytostatický faktor (CSF – cytostatic factor) (Nurse, 1990).

3.2.1.2 Funkce MPF

MPF je heterodimer, který sestává ze dvou podjednotek: protein kinázy P34^{CDC2}, která je katalytickou podjednotkou o velikosti 34 kDa, a cyklinu B, jenž je regulační podjednotkou o velikosti 45 kDa. Tyto dvě podjednotky vytváří komplexy (Dekel, 1995).

Aktivita MPF je charakteristická svou oscilací v průběhu zrání oocytu a dosahuje vrcholů v obou metafázích (Hashimoto *et* Kishimoto, 1988). Aktivní MPF se objevuje krátce před GVBD, vysokých hladin dosahuje MPF v metafázi I a následně téměř mizí po vydělení prvního pólového tělíska. V metafázi II se aktivita MPF opět objevuje a zůstává na vysokých hodnotách až do oplození (Dekel, 1995).

Pro aktivaci MPF a vytvoření funkčních komplexů je nezbytná fosforylace a defosforylace podjednotky P34^{CDC2}. P34^{CDC2} musí být fosforylována na threoninu 161 a defosforylována na threoninu 14 a tyrosinu 15 (Whitaker, 1996).

Fosforylaci P34^{CDC2} na threoninu 161 způsobuje protein kináza, která se nazývá CDC-aktivující kináza (Dunphy *et* Kumagai, 1991). Defosforylaci P34^{CDC2} zajišťuje zejména fosfatáza CDC25, která P34^{CDC2} defosforyluje na threoninu 14 a tyrosinu 15 a tím aktivuje MPF.

V regulaci aktivity MPF hraje svou roli zejména PKA, která řídí aktivitu fosfatázy CDC25 a MYT1. PKA fosforyluje fosfatázu CDC25 na serinu 287, tím ji inaktivuje, zabraňuje tak obnovení meiotického dělení a významně se podílí na udržení prvního meiotického bloku (Kishimoto, 2003). PKA reguluje také funkci MYT1, na kterou naopak působí pozitivně a umožňuje jí tak fosforylovat P34^{CDC2} a tím inaktivovat MPF (Mehlmann, 2005). Opačný efekt k PKA má protein kináza B (PKB – protein kinase B). Tato kináza je aktivována v období LH vlny a způsobuje fosforylaci MYT1 na serinu 75 a zabraňuje tak negativnímu vlivu MYT1 na aktivaci komplexu P34^{CDC2} – cyklin B (Kishimoto, 2003).

V průběhu prvního meiotického bloku jsou v oocytu akumulovány komplexy inaktivované MPF, tzv. pre-MPF, jež jsou udržovány v inaktivním stavu díky fosforylaci P34^{CDC2} (Gautier *et al.*, 1991). Pokud dojde k poklesu PKA, dojde k aktivaci fosfatázy CDC25, k aktivaci komplexu P34^{CDC2} – cyklin B a dochází k obnovení meiózy a vystoupení oocytu z prvního meiotického bloku (Mehlmann, 2005). Na aktivaci komplexu P34^{CDC2} – cyklinu B se také podílí kináza PLK1 (PLK 1 – polo like kinase 1), která aktivuje fosfatázu

CDC25 a umožňuje tak přeměnu inaktivního pre-MPF na aktivní MPF (shrnutí ve Stojkovic *et al.*, 1999).

Po své aktivaci je MPF začleněna do jádra oocyty (Whitaker, 1996) a podílí se na zrání oocyty zejména iniciací GVBD, kondenzací chromozomů, přeskupováním mikrofilament a reorganizací intermediálních filament (shrnutí ve Stojkovic *et al.*, 1999).

3.2.1.3 Funkce MAPK

Mitogenem aktivovaná protein kináza (MAPK – mitogen-activated protein kinase) patří do rodiny serin/threonin kináz (Whitaker, 1996). V savčích oocytech jsou exprimovány dvě izoformy MAPK – P44 a P42 (Sun *et al.*, 1999). MAPK je podobně jako MPF aktivována v období GVBD, zatímco v období zárodečného váčku zůstává inaktivována (Inoue *et al.*, 1995). Aktivita MAPK zůstává na vysokých úrovních po celou dobu zrání oocyty i v průběhu druhého meiotického bloku v metafázi II. (Kubiak *et al.*, 1993). Hladiny MAPK klesají po oplození oocyty v průběhu prvního mitotického cyklu – při formování prvojader (Whitaker, 1996).

U prasečích oocytů v prvním meiotickém bloku je inaktivní MAPK přítomna v cytoplazmě, později se část MAPK přesouvá do GV ještě před rozpadem zárodečného váčku (Inoue *et al.*, 1998). Jestliže je aktivní MAPK injikována do cytoplazmy oocyty, nedojde ke spuštění procesu GVBD, pokud je však injikována přímo do jádra, způsobí rozpad GV (Inoue *et al.*, 1998). MAPK přenáší signál z cytoplazmy do GV (shrnutí ve Stojkovic *et al.*, 1999).

MAPK je aktivována na rozdíl od MPF prostřednictvím fosforylace, a sice fosforylací tyrosinu 185 a threoninu 183. Tuto fosforylací zajišťuje MEK, označovaná také jako MAPK kináza (MAPKK – mitogen-activated protein kinase kinase) (Crews *et al.*, 1992). Také MAPKK je aktivována prostřednictvím fosforylace, kterou zprostředkovává MOS, protein kináza o velikosti 39 kDa, někdy označovaná jako MAPKKK (Fan *et al.*, 2004). Pokud dojde k inhibici MOS, nemůže být spuštěna signální dráha vedoucí k aktivaci MAPK (Whitaker, 1996).

MAPK je zapojena do regulace zrání oocyty zejména prostřednictvím řízení dynamiky mikrotubulů (de Vantéry *et al.*, 1996). Fosforylovaná MAPK je obvykle spojena s obdobím formování mikrotubulů (Sun *et al.*, 2003). MAPK je vysoce fosforylována v období mezi metafází I a metafází II. Toto období je charakteristické formováním mikrotubulů v dělicím vřeténku (Sun *et al.*, 2001).

MAPK fosforyluje cytoskeletární proteiny a jaderné laminy a hraje tak podstatnou roli v rozdělení buňky (Wehrend *et* Meinecke, 1998). MAPK se významným způsobem podílí na formování dělicího vřeténka metafáze I (Dekel, 1995). Pokud je způsobena inhibice MOS, výsledkem je nefunkčnost kaskády MOS/MEK/MAPK a následkem tohoto dochází k selhání formování dělicího vřeténka (Zhao *et al.*, 1991). MAPK je také zapojena do vytvoření cytokinetického prstence v průběhu vydělení prvního pólového tělíska (Fan *et* Sun, 2003). Inhibice MAPK v přechodu mezi metafází I a metafází II vede k selhání vydělení prvního pólového tělíska (Lee *et al.*, 2000).

V přechodu mezi metafází I a metafází II zůstává MAPK na konstantních úrovních, což poukazuje na roli MAPK v prevenci replikace DNA. Tato myšlenka byla potvrzena studií, kdy inhibice MOS vyústila ve formování jádra a replikaci DNA (Furuno *et al.*, 1994).

3.2.1.4 Funkce CSF

U savčích oocytů dochází po vytvoření dělicího vřeténka metafáze II k opětovnému zablokování meiotického dělení. Tento stav přetrvává až do oplození spermií a je označován jako druhý meiotický blok. Druhý meiotický blok je udržován aktivitou cytotatického faktoru (CSF – cytotatic factor) (Dekel, 1995). V průběhu metafáze II jsou hladiny CSF na vysokých hodnotách, stejně jako hladiny MPF a MAPK. CSF stabilizuje hladiny MPF v metafázi II (Murray *et al.*, 1989).

Hlavní katalytickou součástí CSF je protein kináza MOS (shrnutí ve Stojkovic *et al.*, 1999). MOS stimuluje aktivitu MAPK v metafázi II (Verhlac *et al.*, 1996). Signální dráha MOS a MAPK způsobuje aktivaci a stabilizaci MPF (shrnutí ve Stojkovic *et al.*, 1999) tím, že zabraňuje ubiquitinové degradaci cyklinů (Fan *et* Sun, 2004).

3.2.2 Aktivace oocytu

Průběh meiotického zrání významně ovlivňuje zisk vývojové kompetence, ale také následný embryonální vývoj po aktivaci oocytu. Aktivace zralého, vývojově kompetentního oocytu nebo také dokončení druhého meiotického dělení, nastává po eliminaci faktorů udržujících druhý meiotický blok a zahrnuje události jako je exocytóza kortikálních granul, inaktivace CSF, vydělení druhého pólového tělíska a formování prvojádra (shrnutí v Ito *et* Kashiwazaki, 2012).

Hlavním stimulem pro obnovení druhého meiotického dělení je penetrace spermie nebo partenogenetická aktivace, která způsobuje pulzační uvolnění intracelulárních vápníkových iontů (Ca^{2+}) (Whitaker, 1996). Uvolnění vápníkových iontů zprostředkovává fosfolipáza C zeta (PLC ζ – phospholipase C zeta), signál, který je zprostředkován penetrací spermie. PLC ζ

štěpí fosfolipidy cytoplazmatické membrány a způsobuje zvýšení koncentrace inositol trifosfátu (IP₃ – inositol triphosphate). IP₃ je navázán na receptor endoplazmatického retikula a dochází k uvolnění Ca²⁺ (Keizer *et al.*, 1995).

CSF je faktor citlivý na Ca²⁺ (Dekel, 1995). Vzrůst Ca²⁺ v průběhu fertilizace vyústí v aktivaci kalmodulinu, který aktivuje kalmodulin dependentní protein kinázu II (CAMK II – calmodulin-dependent protein kinase II). CAMK II způsobuje proteolytickou degradaci cyklinu B a MOS a tím zprostředkovává inaktivaci MPF a CSF (Lorca *et al.*, 1993).

Ačkoliv je MPF po aktivaci oocyty rychle inaktivována, MAPK zůstává na stabilních úrovních až do formování prvojádra (Fan *et Sun*, 2003). MAPK je stejně jako CAMK II lokalizována na dělicím vřeténku metafáze II, což naznačuje, že tyto dvě kinázy kooperují. Pokud dojde k inhibici CAMK II, nastává i redukce kinázové aktivity MAPK (Hatch *et Capco*, 2001).

MAPK je defosforylována, a tedy deaktivována v období formování prvojádra prostřednictvím protein kinázy C (PKC – protein kinase C). Deaktivace MAPK je důležitá pro formování prvojádra (Fan *et Sun*, 2003).

Proces meiotického zrání oocyty i jeho aktivace, následný embryonální vývoj a tím výsledek reprodukčních biotechnologií *in vitro* může být negativně ovlivněn faktory, mezi nimiž zaujímá významné místo produkce nefyziologických koncentrací reaktivních forem kyslíku a s tím související vznik oxidativního stresu.

3.3 Oxidativní stres

3.3.1 Vznik oxidativního stresu

Oxidativní stres je stav, ke kterému dochází v důsledku disbalance mezi množstvím reaktivních forem kyslíku a antioxidantními mechanismy organismu (Monaghan *et al.*, 2009). Při buněčných procesech organismu vznikají dva typy volných radikálů – volné kyslíkové radikály (ROS – reactive oxygen species) a volné dusíkaté radikály (RNS - reactive nitrogen species). ROS jsou molekuly nebo fragmenty molekul obsahující jeden nebo více nespárovaných elektronů ve vnějším orbitalu atomu. Přítomnost nespárovaných elektronů dodává ROS významný stupeň reaktivity. Mezi hlavní ROS patří superoxid ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxyl (OH^{\cdot}) (Valko *et al.*, 2004).

Volné radikály mohou vznikat endogenní nebo exogenní cestou. Endogenním zdrojem ROS jsou zejména mitochondrie, peroxisomy, metabolismus cytochromu P450 a aktivace zánětlivých buněk (Inoue *et al.*, 2003). Mitochondrie jsou největším endogenním zdrojem ROS. Ke vzniku ROS zde dochází při přenosu elektronů za procesu oxidativní fosforylace (shrnutí v Mariani *et al.*, 2005). Za exogenní způsob vzniku ROS je zodpovědná celá řada škodlivých látek, jako jsou karcinogeny a xenobiotika (např. chlorované sloučeniny a barbituráty) (Valko *et al.*, 2006), ionizující i neionizující záření, polutanty přítomné v atmosféře a přírodní plyny, jako je ozon (Lykkesfeldt *et Svendsen*, 2007).

ROS nepříznivě působí na některé důležité molekuly živého organismu. Pro svou vysokou reaktivitu mohou způsobit rozsáhlé poškození biomolekul, jako jsou zejména DNA, proteiny a lipidy. Oxidativní stres velmi nepříznivě ovlivňuje stav buněčných membrán. V některých procesech může být však koncentrace ROS nezbytně nutná pro správné fyziologické funkce. Takovým příkladem je například jejich pozitivní vliv na proliferaci a diferenciaci somatických buněk (Dröge, 2002), aktivaci transkripčních faktorů a programovanou buněčnou smrt (Kamata *et Hirata*, 1999) a nezanedbatelnou je také úloha ROS v procesu ovulace (Shkolnik *et al.*, 2011).

Mitochondrie mají na svých membránách lokalizovány antioxidanty, které mají za úkol regulovat hladiny ROS v organele (Cadenas *et Davies*, 2000). Antioxidanty mají schopnost dodat oxidantu elektron, odstranit tak jeho reaktivitu a učinit jej tímto způsobem neškodným pro buňky. Ztrátou elektronu se antioxidanty stávají radikály, jejich stabilita je však vyšší a nejsou tak schopny způsobovat poškození buněk (Lykkesfeldt *et Svendsen*, 2007).

Antioxidant může být enzymatické nebo neenzymatické povahy. Mezi antioxidanty enzymatické povahy, neboli antioxidanty vysoké molekulové hmotnosti, patří kupříkladu enzym superoxid dismutáza, kataláza a glutathion peroxidáza. Mezi antioxidanty povahy neenzymatické, nebo také antioxidanty nízké molekulové hmotnosti, řadíme například vitamín C (kyselinu askorbovou), vitamín E, selen, karotenoidy, glutathion atd. (Valko *et al.*, 2006). Podle Halliwella a Gutteridge (2007) je antioxidantem „*jakákoliv substance, která je přítomna v nízkých koncentracích ve srovnání s oxidačním substrátem a významně ruší či inhibuje oxidaci tohoto substrátu*“.

Superoxid dismutáza (SOD – superoxid dismutase) je jedním z nejefektivnějších antioxidantů enzymatické povahy. Její funkcí je zejména přeměna superoxidového anionu na kyslík a méně reaktivní peroxid vodíku (McCord *et* Fridovich, 1969). Enzymatický antioxidant kataláza je přítomný v buněčných organelách peroxisomech. Kataláza způsobuje transformaci peroxidu vodíku na vodu a kyslík (Valko *et al.*, 2006). Kataláza pracuje velmi rychle – uvádí se, že dokáže přeměnit až 6 milionů molekul peroxidu vodíku každou minutu, což z ní činí jeden z nejrychleji pracujících enzymů (Valko *et al.*, 2006). Glutathion peroxidáza je enzym, který se vyskytuje ve dvou formách – na selenu závislé a na selenu nezávislé (Mates *et al.*, 1999). Glutathion peroxidáza má stejně jako kataláza schopnost přeměnit peroxid vodíku na vodu a kyslík (Chelikani *et al.*, 2004).

Za fyziologických podmínek je udržována rovnováha mezi ROS a antioxidanty. Pokud však dochází k nárůstu ROS, antioxidantivní ochrana nedokáže tomuto zvýšení koncentrace ROS čelit a dochází k oxidativnímu stresu. Biologický význam má zejména superoxidový anion (Finkel *et* Holbrook, 2000). Superoxidový anion je primárním radikálem a může přes enzymaticky katalyzované nebo kovy katalyzované procesy reagovat s jinými molekulami. Těmito procesy následně vznikají sekundární ROS (Fridovich, 1986).

Další, neméně významnou obranou organismu před oxidativním poškozením jsou také reparační mechanismy, které mohou opravovat následky oxidativního poškození. Mezi tyto mechanismy patří zejména enzymy, jež dokáží vyhledat oxidovanou nebo špatně zabudovanou dusíkatou bázi DNA, vyštěpit ji a nahradit nepoškozenou molekulou (Lykkesfeldt *et* Svendsen, 2007).

I přes činnost antioxidantů a jiných obranných mechanismů organismu má oxidativní poškození často kumulativní charakter a je udáván jako klíčový při vzniku nemocí jako je rakovina, ateroskleróza, artritida, neurodegenerativní poruchy a mnoho dalších (Halliwell *et* Gutteridge, 2007).

3.3.2 Dopad oxidativního stresu na organismus

Oxidativní stres může mít prostřednictvím svého škodlivého vlivu na biomolekuly negativní dopad na zdraví živého organismu. ROS mohou být zdrojem poškození biomolekul, zejména nukleových kyselin, lipidů a proteinů a v důsledku toho mají negativní vliv i na integritu buněčných membrán (Valko *et al.*, 2006).

Zejména nebezpečný je v tomto případě stav, kdy dochází k tzv. Fentonově reakci, kdy při rozpadu peroxidu vodíku za přítomnosti kovu (zejména železa, mědi, chromu, kobaltu, ale i některých dalších kovů) vzniká vysoce reaktivní hydroxylový radikál (Valko *et al.*, 2006).

Hydroxylový radikál je schopen reagovat se všemi složkami DNA a poškozovat purinové a pyrimidinové báze stejně jako deoxyribózovou kostru DNA. Tato poškození jsou zodpovědná za stárnutí, mutagenezi a karcinogenezi (Dizdaroglu *et al.*, 2002). Poškození jednotlivých složek DNA spočívá zejména v modifikaci purinových a pyrimidinových bází a cukru deoxyribózy, dále ve fragmentaci molekuly DNA a vzniku příčných vazeb DNA (Valko *et al.*, 2006). V důsledku těchto změn může dojít k iniciaci anebo naopak zablokování transkripce, k poruchám replikace molekuly DNA a následné nestabilitě genomu, která může vyústit v rakovinové bujení. Jedním z nejčastějších markerů oxidativního stresu *in vivo* je 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin (8-OH-dG) (Toyokuni *et Sagripanti*, 1994). V ledvinových tumorech byl nalezen vyšší obsah tohoto markeru než v okolních tkáních napadených ledvin, u jiných orgánů napadených tumorem se objevily podobné výsledky (Toyokuni *et Sagripanti*, 1994).

Hydroxylové radikály jsou také zodpovědné za peroxidaci lipidů přítomných v buněčných membránách a poškození proteinů. Onemocnění, která vznikají v důsledku těchto změn, jsou různého typu. Oxidativní poškození se významně podílí na degenerativních změnách mozku. Mozek obsahuje množství na peroxidaci lipidů citlivých, polynenasycených mastných kyselin, a také ve srovnání s jinými orgány obsahuje nižší množství antioxidantní obrany (shrnutí v Mariani *et al.*, 2005). Výzkumy, které zkoumaly vliv oxidativního stresu na vznik Alzheimerovy choroby (AD – Alzheimer disease) u lidí zjistily, že v mozcích poškozených AD se nachází zvýšené množství markerů oxidativního stresu (Smith *et al.*, 2000).

Při zvýšené produkci ROS dochází ke změnám cévních buněk, jež vedou k arteriální hypertenzi. Hlavní příčinou arteriální hypertenze je dysfunkce endotelu a nárůst objemu jemných cévních svalových vláken. Toto je způsobeno reakcí superoxidového anionu s oxidem dusnatým (NO – nitric oxide), který je produkován endoteliálními buňkami

(Beckman *et al.*, 1990). Při této reakci vzniká peroxynitrit, který způsobuje oxidaci DNA, proteinů a lipidů v cévních buňkách (Ballinger *et al.*, 2000).

Oxidativní poškození se podílí také na vzniku aterosklerózy. K tomuto onemocnění dochází v důsledku tvorby tukových pruhů ve stěnách krevních cév. K tomuto procesu přispívá významným způsobem oxidativní modifikace lipoproteinů nízké density (LDL – lipoprotein low density) (Cox *et al.*, 1996).

3.3.3 Dopad oxidativního stresu na reprodukční funkce

Folikulární tekutina (FF – follicular fluid) je prostředí, ve kterém se nachází a vyvíjí oocyt, a tak významně ovlivňuje jeho budoucí kvalitu. FF obsahuje fyziologické množství ROS a antioxidantů. Tyto hladiny ROS naznačují skutečnost, že fyziologické množství ROS ve folikulární tekutině je nezbytné pro správný průběh meiotického zrání. Ve vyvíjejících se folikulech, Graafových folikulech, membránách granulózních buněk a post-ovulačních folikulech lidských vaječníků byly nalezeny izoformy SOD (Shiotani *et al.*, 1991) stejně jako ve vaječnicích potkanů (Laloraya *et al.*, 1989).

Folikulární tekutina po přidání do kultivačního média oocytů při zrání *in vitro* významně zlepšuje úspěšnost zrání a pozitivně působí zejména na zrání cytoplazmy (Tatemoto *et al.*, 2004). V *in vivo* podmínkách jsou hodnoty ROS v FF udržovány antioxidantními mechanismy. V *in vitro* podmínkách jsou však oocyty vyjmuty z prostředí FF a dochází tak ke ztrátě přirozené antioxidantní ochrany oocytu. Tato skutečnost může negativně ovlivnit výsledky reprodukčních biotechnologií *in vitro*.

Názory na to, jak hladiny ROS ovlivňují reprodukční funkce, se různí. Attaran *et al.*, (2000) uvádí pozitivní vliv zvýšených koncentrací ROS v lidské folikulární tekutině na následné gravidity. Naproti tomuto Jozwik *et al.* (1999) neprokázal žádnou korelaci mezi koncentrací oxidantů ve FF a schopností koncepce u žen. Chaube *et al.* (2005) uvádí, že peroxid vodíku se podílí na indukci rozpadu zárodečného váčku (GVBD – germinal vesicle breakdown) a obnovení meiotického dělení z prvního meiotického bloku. Naopak Tamura *et al.* (2008) uvádí inhibiční efekt peroxidu vodíku na GVBD. Tyto rozporuplné výsledky naznačují, že nejdůležitějším faktorem pro úspěšné zrání oocytů je rovnováha ROS a antioxidantů.

Většina studií však popisuje spíše negativní vliv ROS na reprodukční funkce. Negativní dopad ROS byl zejména pozorován při zrání oocytů *in vitro*. Bylo zjištěno, že vysoké hladiny ROS se podílejí i na zhoršeném formování cytoskeletárních komponent meiotického zrání oocytu. U myších oocytů mají vysoké hladiny ROS negativní vliv na formování dělicího

vřeténka metafáze II a následkem tohoto dochází k aneuploidii (Tarin, 1996). ROS inhibují zrání oocyty u myši (Tamura *et al.*, 2008), při *in vitro* zrání prasečích oocytů bylo dokázáno, že inhibice enzymu SOD způsobuje redukci meiotického zrání, fragmentaci DNA a následnou apoptózu (Tatemoto *et al.*, 2004).

Negativní dopad na výsledky reprodukčních biotechnologií *in vitro* má také proces stárnutí oocytů, který je úzce spjat s působením ROS. Pokud u oocyty dochází k procesu stárnutí, oocyt podléhá závažným degenerativním změnám, mezi něž patří pokles oplozeníschopnosti, chromozomální anomálie, částečná exocytóza kortikálních granulí, změny struktury *zony pellucidy* a její tvrdnutí, pokles hladin MPF a MAPK, abnormální vývoj embrya a mnoho dalších (Miao *et al.*, 2009).

3.4 Sirné sloučeniny česneku

Množství studií u česneku potvrdilo účinky antibakteriální, antivirotické, antiplísňové a antioxidantní (Iciek *et al.*, 2009). Tyto léčivé vlastnosti česneku jsou přisuzovány zejména sirným sloučeninám česneku. V nepoškozených česnekových cibulích je přítomný zejména alliin, γ -glutamyl-S-allylcystein (GSAC), S-methylcystein sulfoxid, S-*trans*-1-propenylcystein sulfoxid, S-2-karboxypropylglutathion a v menších koncentracích i S-allylcystein (SAC) (Amagase, 2006).

3.4.1 Vznik a metabolismus sirných sloučenin česneku

Primární sirnou sloučeninou česneku, která se vyskytuje v intaktních cibulích česneku je alliin. Pokud dojde k narušení struktury česnekové cibule, velmi rychle je alliin prostřednictvím enzymu alliinázy, která je uvolněna při porušení cibule, přeměněn na allicin. Při této reakci dochází také ke vzniku vedlejších produktů – pyruvátu a amonného iontu (Iciek *et al.*, 2009). Allicin pravděpodobně nemá přímé biologické účinky, neboť jeho molekula je velmi nestabilní a má krátký poločas rozpadu. Již několik minut po jeho přidání do krve nebyly nalezeny žádné stopy allicinu (Freeman *et* Kodera, 1995). Allicin je však meziproduktem ke vzniku biologicky účinných sirných sloučenin česneku.

Biologicky účinné sirné sloučeniny česneku jsou rozděleny na liposolubilní a hydrosolubilní (Iciek *et al.*, 2009). V tuku rozpustné sloučeniny jsou zejména polysulfidy, ve které se allicin snadno přeměňuje. Transformací allicinu nejčastěji vzniká diallyl disulfid (DADS – diallyl disulphide), dále diallyl sulfid (DAS – diallyl sulphide), diallyl trisulfid (DATS – diallyl trisulphide) a diallyl tetrasulfid. Poměr těchto látek v česnekovém extraktu závisí na podmínkách prostředí, v nichž byla extrakce prováděna (Brodnitz *et al.*, 1971).

Ve vodě rozpustné sírné sloučeniny česneku vznikají při reakci allicinu s thiolovou skupinou –SH. Touto reakcí vzniká SAC nebo S-allylmercaptocystein (SAMC – S-allylmercaptocysteine) (Rabinkov *et al.*, 2000). Ve vodě rozpustné sírné sloučeniny česneku, které vznikají vodnou extrakcí vykazují biologické efekty *in vivo* a *in vitro*. V průběhu extrakce GSAC transformuje na SAC a jeho deriváty S-methylcystein (SMC – S-methylcysteine) a SAMC (Iciek *et al.*, 2009).

Allicin nemůže vznikat bez přítomnosti enzymu allinázy. Některé studie dokázaly přítomnost alliinů v savčím žaludku, střevech a játrech krátce po jeho pozření, ale neprokázaly přítomnost odvozených sloučeniny allicinu (Guo *et al.*, 1990). Pokud je allicin aplikován přímo do krve, je rychle přeměněn na allyl merkaptan, který je meziproduktem s krátkým poločasem rozpadu (Lawson *et Wang*, 2005).

Allyl merkaptan se rychle transformuje v allyl methyl sulfid (AMS – allyl methyl sulfide). AMS může být dále metabolizován na oxidované formy allyl methyl sulfoxid (AMSO – allyl methyl sulfoxide) a allyl methyl sulfon (AMSO₂ – allyl methyl sulfone) (Germain *et al.*, 2002). V moči zvířat, kterým byl podáván SAC, byl nalezen N-acetyl-S-allylcystein (Jandke *et Spiteller*, 1987).

3.4.2 Antioxidativní účinky sírných sloučenin česneku

Konzumace česneku pozitivně koreluje se snižujícím se rizikem vzniku chorob, které jsou způsobené oxidativním stresem. Mezi tyto nemoci patří zejména některé druhy rakoviny (Steinmetz *et al.*, 1994; Fleischauer *et al.*, 2000; Challier *et al.*, 1998) a kardiovaskulární choroby (Brace, 2002).

Sírné sloučeniny česneku vykazují antioxidantní aktivitu, jak prokázala řada studií zabývajících se výzkumem somatických buněk. V *in vitro* studiích bylo dokázáno, že sloučeniny česneku jsou schopné vychytávat volné radikály a zabraňovat vzniku produktu peroxidace lipidů – malondialdehydu (Prasad *et al.*, 1996). Čerstvý česnekový homogenát zvyšuje hladiny endogenních antioxidantů a zároveň redukuje peroxidaci lipidů (Banerjee *et al.*, 2001).

In vitro studie také prokázaly, že allicin, sloučenina, která má krátký poločas rozpadu, dokáže v *in vitro* podmínkách zabraňovat peroxidaci lipidů prostřednictvím vychytávání hydroxylových radikálů (Prasad *et al.*, 1995). *In vivo* je však allicin velmi rychle metabolizován. Jestliže však allicin reaguje s L-cysteinem a glutathionem, vzniká S-allylmercaptocystein (SAMC – S-allylmercaptocysteine) a S-allylmercaptogluthathion (GSSA). Tyto dvě sloučeniny *in vivo* působí jako antioxidanty. Při studiích účinku SAMC bylo

zjištěno, že tato sloučenina zabraňuje peroxidaci lipidů jaterních buněk po administraci acetaminofenem (Sumioka *et al.*, 1998). GSSA inhibuje produkci lipidových peroxidů (Rabinkov *et al.*, 2000).

Antioxidativní aktivitu vykazují i v tuku rozpustné sirmé sloučeniny česneku – zejména DAS, DADS a DATS, které výrazně navyšují aktivitu antioxidantu glutathion reduktázy a zrychlují aktivitu SOD. Při studiích *in vitro* bylo dokázáno, že DADS má schopnost snižovat lipidovou peroxidaci indukovanou NADPH, askorbátem a doxorubicinem (Dwivedi *et al.*, 1998).

Sirmé sloučeniny vyzrálého česnekového extraktu (AGE – aged garlic extract), zejména SAC, jehož působením se zabývá i tato diplomová práce, mají nejsilnější antioxidantivní aktivitu ze všech komerčně dostupných česnekových preparátů. SAC a SAMC jsou stabilní sloučeniny, které jsou ve vysokých hodnotách obsaženy v AGE. AGE vzniká uchováním pokrájeného česneku v 15-20 % ethanolu po dobu 20 měsíců v pokojové teplotě (Iciek *et al.*, 2009).

Tyto sirmé sloučeniny vykazují schopnost vychytávat volné radikály (Imai *et al.*, 1994), působí antioxidantivně prostřednictvím zvyšování hladin antioxidantů v buňkách a zabraňují oxidaci lipoproteinů nízké density (LDL – low density lipoprotein) (Lau, 2001). Sirmé sloučeniny AGE jsou charakteristické svou schopností snižovat peroxidaci lipidů a zvyšovat hladiny glutathionu a aktivitu glutathion peroxidázy (Balasenthil *et al.*, 1998). SAMC a SAC dokáží potlačovat produkci peroxidu vodíku a superoxidu (Wei *et Lau*, 1998). SAMC a SAC se podílí na protizánětlivých procesech prostřednictvím inhibice nukleárního faktoru kappa B (NF – κ B – nuclear factor kappa B). Tento faktor je aktivován oxidativním stresem a je zodpovědný za expresi prozánětlivých enzymů (Ide *et Lau*, 2001). Sloučeniny obsažené v AGE stimulují buněčné antioxidanty, zejména redukovaný glutathion a enzymy SOD, katalázu a glutathion peroxidázu v endoteliálních buňkách (Geng *et Lau*, 1997). Nemalý podíl mají sloučeniny přítomné v AGE také na ochraně buněk proti radiaci. Bylo dokázáno, že SAC a SAMC zvyšuje odolnost buněk proti ionizujícímu záření a poškození způsobenému UV zářením (Chittezhath *et Kuttan*, 2006).

SAC významně zabraňuje poškození membrán, zvyšuje životnost buněk a snižuje peroxidaci lipidů v buněčných membránách endoteliálních buněk (Ide *et Lau*, 1999). SAC inhibuje formování peroxynitritu, který má destruktivní vliv na molekulu DNA (Numagami *et al.*, 1996). Podobně jako v tuku rozpustné sirmé sloučeniny SAC redukuje doxorubicin, který významně přispívá k produkci ROS a peroxidaci lipidů (Mostafa *et al.*, 2000).

Je velice pravděpodobné, že zapojení sirných sloučenin česneku, zejména SAC, v antioxidantní obraně somatických buněk, může mít pozitivní vliv i na prevenci produkce nefyziologických hladin ROS u samičích pohlavních buněk při použití reprodukčních biotechnologií *in vitro* a může tak výrazně zvýšit úspěšnost těchto technologií.

4 Materiál a metodika

4.1 Aspirace a kultivace prasečích oocytů

Pro experimentální účely byly získány oocyty spolu s kumulárními buňkami, tzv. kumulo-oocytární komplexy (COCs - cumulus-oocyte complexes), které byly vyjmuty *post mortem* z ovarií pre-pubertálních prasniček. Tento materiál byl při převozu z jatek uchováván ve fyziologickém roztoku (0,9 % chlorid sodný) o teplotě 39 °C a zpracován do 2 hodin po vyjmutí ze zvířete.

Komplexy byly aspirovány z ovariálních folikulů, které dosahovaly velikosti od 2 do 5 mm za pomoci injekční stříkačky a jehly velikosti 20G (šířka 0,9 mm). Po aspiraci proběhla za pomoci binokulární lupy selekce oocytů ke kultivaci. Byly vybírány pouze oocyty, které měly kompaktní vrstvu kumulárních buněk, neporušenou cytoplasmu a dosahovaly velikosti 120-125 μm v průměru.

COCs byly před kultivací třikrát propláchnuty v kultivačním médiu. Následně proběhla jejich kultivace ve čtyřjamkové Petriho misce (Nunc, Denmark) v 1 ml modifikovaného kultivačního média M199 (Sigma-Aldrich, USA), které obsahovalo gonadotropní hormony eCG a hCG v poměru 13.-5 I.U.: 6,6 I.U./ml (P.G.600; Intervet, Holland), 10% (v/v) fetálního bovinního séra (GibcoBRL; Life Technologies, Deutschland), hydrogenuhličitan sodný (32,5 mM), laktát vápenatý (2,75 mM), gentamicin (0,025 mg/ml), HEPES (6,3 mM) v prostředí řízené atmosféry 5 % CO₂ ve směsi se vzduchem při 39 °C po dobu 24 a 48 hodin. Experimentální skupina byla kultivována za přítomnosti S-allylcysteinu (0,1 mM – 1 mM; Sigma-Aldrich).

4.1.1 Hodnocení vlivu sirných sloučenin česneku na jaderné 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 ethanolu 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 stádiu pozdní diakineze (late diakinesis), MI – metafáze prvního meiotického dělení, AITI – oocyty přecházející z anafáze do telofáze prvního meiotického dělení, MII – metafáze druhého

meiotického dělení a nakonec Dg – oocyty s degenerovaným chromatinem (Motlik *et Fulka*, 1976).

4.1.2 Určení produkce reaktivních forem kyslíku

Pro stanovení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species) byl používán 2', 7'- dichlorofluorescein diacetát (DCHFDA). Po ukončení kultivace byly oocyty zbaveny kumulárních buněk technikou opakovaného protahování tenkou skleněnou kapilárou. Následně byly oocyty 3x opláchnuty v PBS-PVA a inkubovány v PBS-PVA s DCHFDA (10 μ M) po dobu 10 minut a v PBS-PVA s DCHFDA (10 μ M) a Hoechst 33258 po dobu dalších 10 minut při teplotě 39°C. Oocyty byly dále 3x propláchnuty v PBS-PVA a montovány mezi podložní a krycí sklíčko. Z namontovaných oocytů byly ihned 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 4.30 (Laboratory Imaging, Czech Republic) a okamžitě došlo ke stanovení produkce ROS. Preparáty byly hodnoceny na fluorescenčním mikroskopu (exc. 450-490 nm). Pomocí analýzy obrazu NIS Elements 4.30 byla měřena intenzita signálu.

4.1.3 Imunocytochemická analýza

Imunocytochemická lokalizace štěpené formy kaspázy 3 byla provedena podle postupu publikovaného v práci Yi *et al.* (2014). Oplozené oocyty byly po ukončení kultivace nafixovány ve 2 % formaldehydu po dobu 40 minut při laboratorní teplotě. Posléze byly oocyty opláchnuty PBS-NaN₃, permeabilizovány v PBS NaN₃ s 0,1 % Triton-X-100 (PBS-NaN₃-TX) po dobu 40 minut a blokovány v roztoku 5 % NGS (Normal Goat Serum) v PBS-NaN₃-TX. Oocyty byly inkubovány s primární myší protilátkou anti-cleaved caspase 3 (Abcam, USA; 1:200 v 1 % NGS v PBS-NaN₃-TX), přes noc při 4 °C. Poté byly oocyty dvakrát opláchnuty a inkubovány se sekundární protilátkou anti-myší IgG konjugovanou s fluoresceinem isothiokyanátem (FITC) po dobu 40 minut při laboratorní teplotě. Po ukončení kultivace byly oocyty dvakrát opláchnuty a montovány do montovacího média Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, USA). Z namontovaných oocytů byly vyhotoveny obrázky za pomoci invertovaného mikroskopu (Nikon, Japan) při excitační vlnové délce 450-490 nm, kamery Clara CCD Camera (Andor Technology, UK) a softwaru NIS Elements 4.30 (Laboratory imaging, Czech Republic).

4.2 Analýza obrazu

Získané obrázky z připravených preparátů byly podrobeny analýze obrazu v programu NIS Elements 4.30 (Laboratory Imaging, Czech Republic). V oocytech byla měřena intenzita signálu. Signál byl následně kvantifikován a hodnoceny byly příznaky měření definované pomocí NIS Elements. Mezi příznaky měření byla sledována 1) suma intenzity a 2) suma intenzity/ROI (region of interest). Suma intenzity vyjadřuje součet intenzity pixelů v ROI, které byly procesem prahování označeny jako pixely s pozitivním signálem. ROI označuje manuálně vyznačenou plochu oocytu, suma intenzity/ROI je tedy podíl sumy intenzity a plochy oocytu.

4.3 Statistická analýza

Každý experiment byl opakován šestkrát. Výsledky jsou uvedeny jako průměr z jednotlivých opakování \pm S.E.M. (standard error of the mean). Výsledky pokusů a rozdíly mezi kontrolní a pokusnými skupinami SAC 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.

5 Výsledky

V diplomové práci byly provedeny experimenty zaměřené na vliv S-allylcysteinu (SAC) na jaderné zrání oocytů, produkci reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species) a expresi markeru časně apoptózy – štěpené formy kaspázy 3.

5.1 Vliv SAC na jaderné zrání prasečích oocytů *in vitro*

V experimentu 1 bylo hodnoceno, jaký je vliv SAC na jaderné zrání oocytů. Pro hodnocení tohoto vlivu na jaderné zrání byly oocyty rozděleny do dvou skupin. První skupina byla kultivována se třemi odlišnými koncentracemi SAC po dobu 24 hodin, druhá skupina byla kultivována za přítomnosti SAC po dobu 48 hodin. Každá skupina obsahovala zároveň kontrolní skupinu oocytů (K), která byla kultivována za absence SAC. Experimentální skupiny oocytů byly kultivovány ve třech rozdílných koncentracích SAC – 0,1 mM; 0,5 mM a 1 mM SAC. Po kultivaci oocytů v přítomnosti SAC následovalo hodnocení jednotlivých stádií meiotického zrání.

5.1.1 Hodnocení stádia jaderného zrání oocytů po 24 hodinách kultivace

Pro vyhodnocení oocytů kultivovaných po dobu 24 hodin bylo použito celkem 575 oocytů včetně kontrolní skupiny. Jednotlivá stádia, jichž dosáhly oocyty po kultivaci trvajících 24 hodin, byla vyjádřena procentuálně z celkového množství kultivovaných oocytů v dané koncentraci (Tab. 1).

Jak vyjadřuje uvedená tabulka č. 1, oocyty všech experimentálních skupin dosáhly předpokládaného stádia jaderného zrání odpovídajícímu 24 hodinové kultivaci, metafáze I. Stádia metafáze I dosáhlo 91,68 – 95,24 % všech oocytů včetně kontrolní skupiny. Nejvyšší procentuální zastoupení oocytů ve stádiu metafáze I (95,24 %) bylo při kultivaci za přítomnosti 0,5 mM SAC, nejnižší procentuální zastoupení oocytů ve stádiu metafáze I (91,68 %) se objevilo při kultivaci za přítomnosti 0,1 mM SAC. Nejmenší procentuální zastoupení měly oocyty ve stádiu pozdní diakineze (0,00 – 2,65 %) a stádiu metafáze II (0,00 – 1,86 %). Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi kontrolními (K) a experimentálními skupinami oocytů (0,1; 0,5; 1 mM SAC), na hladině významnosti ($p < 0,05$).

Tabulka 1: Procentuální vyjádření jednotlivých stádií oocytů dosažených po 24 hodin trvající kultivaci v přítomnosti SAC

	K	0,1 mM SAC	0,5 mM SAC	1 mM SAC
GV (%)	2,54 ^a ± 3,96	0,54 ^a ± 1,32	4,12 ^a ± 3,99	0,60 ^a ± 1,46
LD (%)	1,30 ^a ± 2,03	0,67 ^a ± 1,63	0,64 ^a ± 1,57	1,19 ^a ± 1,85
MI (%)	92,40 ^a ± 2,38	91,68 ^a ± 2,81	95,24 ^a ± 4,25	91,99 ^a ± 5,61
AITI (%)	1,11 ^a ± 2,72	3,86 ^a ± 3,74	0,00 ^a ± 0,00	2,35 ^a ± 3,96
MII (%)	0,00 ^a ± 0,00	1,86 ^a ± 2,07	0,00 ^a ± 0,00	1,55 ^a ± 2,40
Dg (%)	2,65 ^a ± 4,30	1,39 ^a ± 2,16	0,00 ^a ± 0,00	2,32 ^a ± 4,18
n	143	146	141	145

K – negativní kontrola, GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku (germinal vesicle), LD – oocyty ve stádiu pozdní diakineze (late diakinesis), MI – oocyty ve stádiu metafáze I, AITI – oocyty ve stádiu anafáze I a telofáze I, MII – oocyty ve stádiu metafáze II, Dg – oocyty s degenerovaným chromatinem, n – počet oocytů

^{a,b} superskripty označují statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami v rámci stejného stádia meiotického zrání (v řádku)

5.1.2 Hodnocení stádia jaderného zrání oocytů po 48 hodinách kultivace

Pro vyhodnocení oocytů kultivovaných po dobu 48 hodin bylo použito celkem 496 oocytů včetně kontrolní skupiny. Jednotlivá stádia, jichž dosáhly oocyty po kultivaci trvající 48 hodin, byla vyjádřena procentuálně z celkového množství kultivovaných oocytů v dané koncentraci (Tab. 2).

Převážná většina oocytů dosáhla předpokládaného stádia jaderného zrání odpovídajícímu 48 hodinové kultivaci, metafáze II. Oocyty ve stádiu metafáze II měly nejvyšší procentuální zastoupení v kontrolní skupině (92,69 %) a nejnižší u skupiny kultivované při koncentraci 0,5 mM SAC (90,04 %). Metafáze II dosáhlo 90,04 - 92,69 % všech oocytů včetně kontrolní skupiny. Podobně jako v předchozím případě, nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi kontrolními (K) a experimentálními skupinami oocytů (0,1; 0,5; 1 mM SAC) na hladině významnosti ($p < 0,05$).

Tabulka 2: Procentuální vyjádření jednotlivých stádií oocytů dosažených po 48 hodinách trvající kultivaci v přítomnosti SAC

	K	0,1 mM SAC	0,5 mM SAC	1 mM SAC
GV (%)	1,23 ^a ± 1,93	0,00 ^a ± 0,00	1,23 ^a ± 3,02	0,00 ^a ± 0,00
LD (%)	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00
MI (%)	0,69 ^a ± 1,70	0,00 ^a ± 0,00	0,60 ^a ± 1,46	1,67 ^a ± 2,79
AITI (%)	2,89 ^a ± 4,88	6,06 ^a ± 2,30	3,49 ^a ± 4,52	3,61 ^a ± 3,06
MII (%)	92,69 ^a ± 4,43	90,48 ^a ± 5,52	90,04 ^a ± 2,43	90,75 ^a ± 4,04
Dg (%)	2,50 ^a ± 4,72	3,46 ^a ± 4,64	4,64 ^a ± 5,45	3,97 ^a ± 3,89
n	122	121	127	126

K – negativní kontrola, GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku (germinal vesicle), LD – oocyty ve stádiu pozdní diakineze (late diakinesis), MI – oocyty ve stádiu metafáze I, AITI – oocyty ve stádiu anafáze I a telofáze I, MII – oocyty ve stádiu metafáze II, Dg – oocyty s degenerovaným chromatinem, n – počet oocytů

^{a,b} superskripty označují statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami v rámci stejného stádia meiotického zrání (v řádce)

5.2 Vliv SAC na produkci ROS v průběhu meiotického zrání *in vitro*

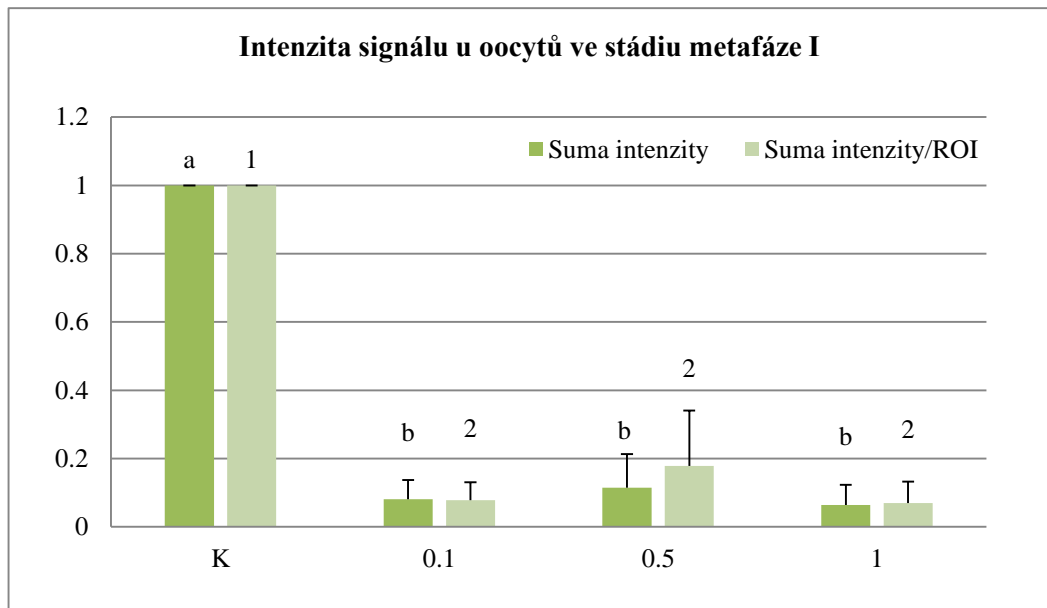
V experimentu 2 bylo hodnoceno, jaký vliv má SAC na produkci ROS v průběhu meiotického zrání. Produkce ROS byla měřena pomocí fluorescenčního signálu látky 2', 7' - dichlorofluorescein diacetátu (DCHFDA). U oocytů byl hodnocen vliv SAC na produkci ROS v jedné kontrole (K) a třech koncentracích SAC – 0,1 mM; 0,5 mM a 1 mM. Kontrola je skupina oocytů kultivována za absence SAC a přítomnosti DCHFDA. Jako negativní kontrola (K-) byly použity oocyty kultivované bez DCHFDA a sloužily k ověření specifity měřeného signálu.

Produkce ROS byla měřena u oocytů ve stádiu metafáze I a metafáze II. Intenzita signálu byla vyhodnocena prostřednictvím analýzy obrazu NIS Elements 4.30 pomocí příznaků měření – sumy intenzity a sumy intenzity/ROI (region of interest).

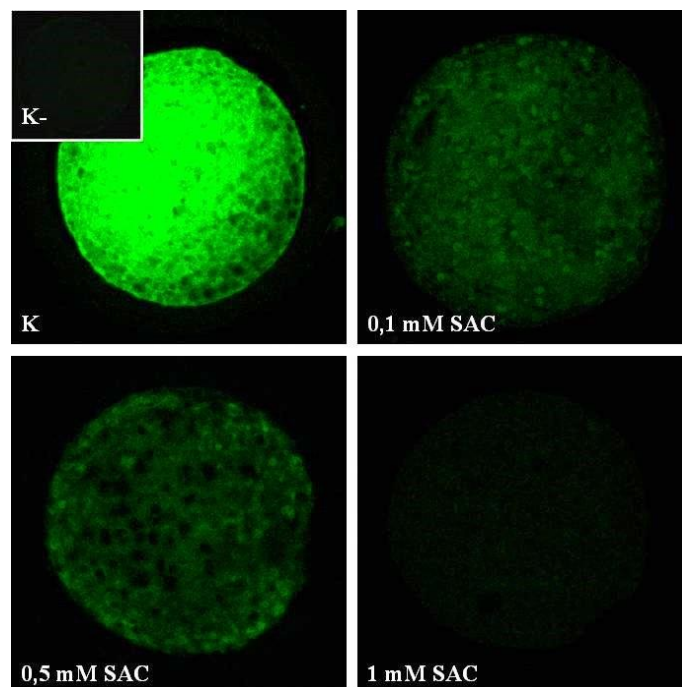
5.2.1 Hodnocení intenzity signálu ROS u oocytů ve stádiu metafáze I

Produkce ROS oocyty v metafázi I byla hodnocena celkem u 131 oocytů včetně kontrolní skupiny. Jednotlivé intenzity signálu jsou vyjádřeny na obrázku č. 2.

Při koncentraci 0,1 mM SAC byl patrný pokles sumy intenzity oproti kontrolní skupině o 91,87 %, při koncentraci 0,5 mM SAC došlo k poklesu sumy intenzity ve srovnání s kontrolní skupinou o 88,57 % a při koncentraci 1 mM SAC byl zaznamenán pokles sumy intenzity oproti kontrolní skupině o 93,58 %. Z výsledků je tedy patrné, že nejvýraznější pokles sumy intenzity signálu nastal při kultivaci v koncentraci 1 mM SAC a nejnižší pokles byl zaznamenán při kultivaci za přítomnosti 0,5 mM SAC. Byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou oocytů (K) a experimentální skupinou oocytů na hladině významnosti ($p < 0,05$).



Obrázek 2: Produkce ROS po kultivaci v přítomnosti SAC (mM) ve stádiu metafáze I
a,b,1,2 rozdílné superskripty označují statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami oocytů jednotlivě pro každý příznak měření



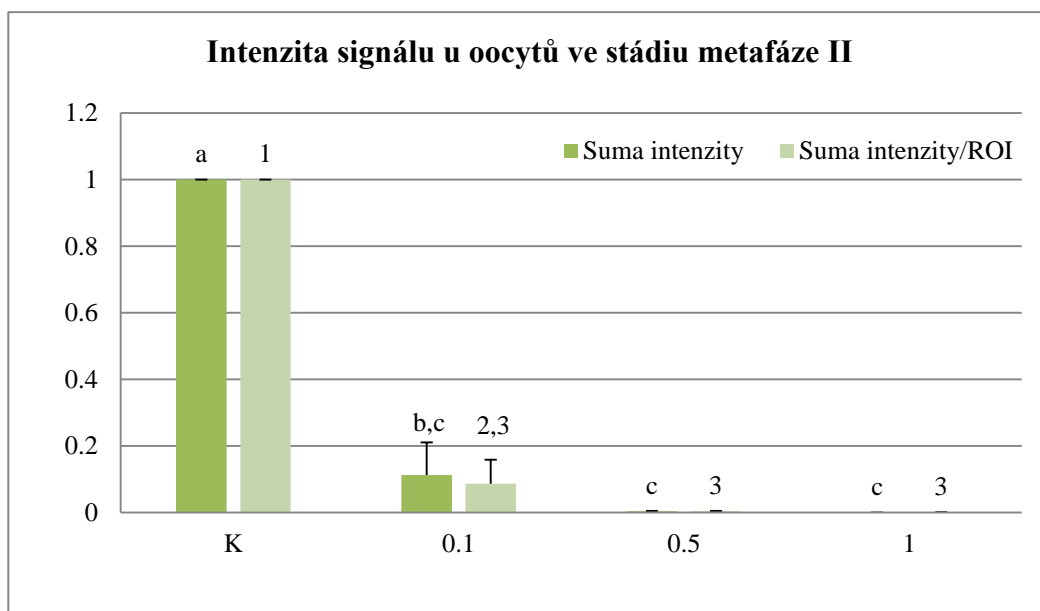
Obrázek 3: Reprezentativní obrázek oocytů jednotlivých experimentálních skupin barvených DCHFDA pro vizualizaci ROS

K – kontrola, *K-* - negativní kontrola, *0,1 mM SAC* – oocyt kultivovaný za přítomnosti *0,1 mM SAC*, *0,5 mM SAC* – oocyt kultivovaný za přítomnosti *0,5 mM SAC*, *1 mM SAC* – oocyt kultivovaný za přítomnosti *1 mM SAC*

5.2.2 Hodnocení intenzity signálu ROS u oocytů ve stádiu metafáze II

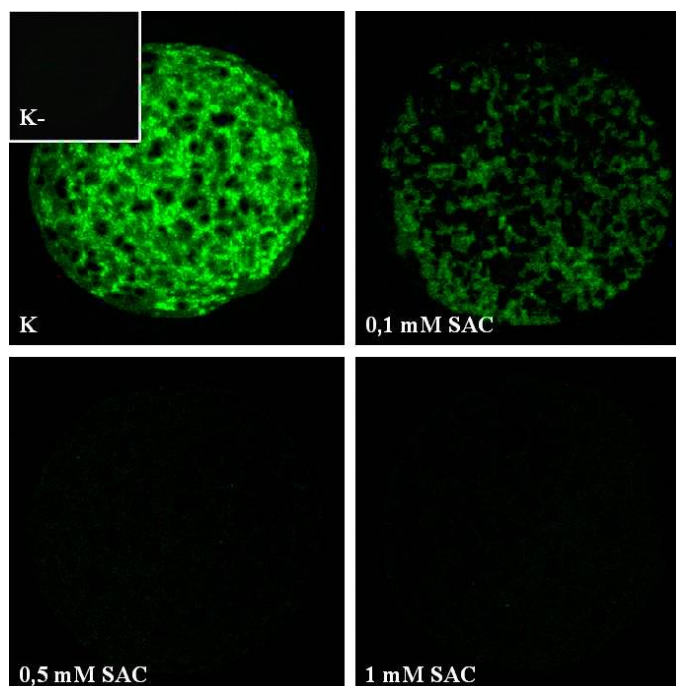
Produkce ROS oocyty v metafázi II byla hodnocena celkem u 199 oocytů včetně kontrolní skupiny. Jednotlivé intenzity signálu byly vyhodnoceny na obrázku č. 4. Hodnota sumy intenzity poklesla u oocytů kultivovaných při 0,1 mM SAC oproti kontrolní skupině oocytů o 88,72 %, suma intenzity oocytů kultivovaných při 0,5 mM SAC poklesla o 99,56 % a suma intenzity oocytů kultivovaných při 1 mM SAC poklesla o 99,95 %. Je zřejmé, že suma intenzity má v tomto případě klesající tendenci. Nejvýraznější pokles signálu byl zaznamenán u skupiny oocytů kultivovaných za přítomnosti 1 mM SAC. Byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou oocytů (K) a skupinou oocytů kultivovaných za přítomnosti SAC na hladině významnosti ($p < 0,05$).

Zároveň byl ověřen statisticky významný rozdíl mezi oocyty kultivovanými při 0,1 mM a oocyty kultivovanými při 0,5 mM SAC a 1 mM SAC. Hodnota sumy intenzity poklesla v porovnání s intenzitou skupiny při 0,1 mM SAC o 96,1 % (0,5 mM SAC) a výrazný pokles je zřejmý i u koncentrace 1 mM SAC, kdy došlo k poklesu dokonce o 99,57 %. I zde byla patrná klesající tendence.



Obrázek 4: Produkce ROS po kultivaci v přítomnosti SAC (mM) ve stádiu metafáze II

a,b,c,1,2,3 rozdílné superskripty označují statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami oocytů jednotlivě pro každý příznak měření



Obrázek 5: Reprezentativní obrázek oocytů jednotlivých experimentálních skupin barvených DCHFDA pro vizualizaci ROS

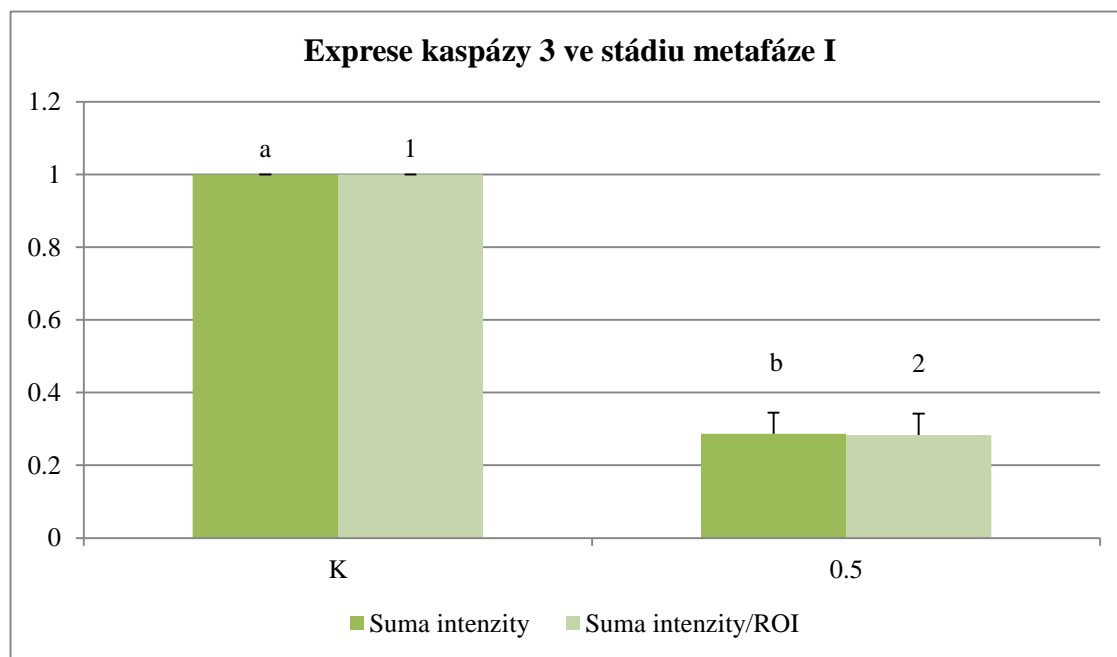
K – kontrola, K- - negativní kontrola, 0,1 mM SAC – oocyt kultivovaný za přítomnosti 0,1 mM SAC, 0,5 mM SAC – oocyt kultivovaný za přítomnosti 0,5 mM SAC, 1 mM SAC – oocyt kultivovaný za přítomnosti 1 mM SAC

5.3 Hodnocení exprese kaspázy 3

Ve třetím experimentu bylo cílem zhodnotit expresi markeru časné apoptózy – štěpené formy kaspázy 3. Kontrolní a experimentální skupiny oocytů byly kultivovány po dobu 24 a 48 hodin. Pro tento experiment byla na základě předchozích výsledků vybrána koncentrace 0,5 mM SAC. Podle dosaženého stádia zrání byla hodnocena exprese kaspázy 3 u oocytů ve stádiu metafáze I a metafáze II. U oocytů byla hodnocena exprese kaspázy 3 u jedné kontrolní skupiny a jedné experimentální skupiny kultivované za koncentrace 0,5 mM SAC. Kaspáza 3 byla vizualizována za použití primární a sekundární myši protilátky konjugované s fluoresceinem isothiokyanátem (FTIC). Intenzita signálu byla vyhodnocena pomocí analýzy obrazu NIS Elements 4.30 pomocí příznaků měření – sumy intenzity a sumy intenzity/ROI (region of interest).

5.3.1 Hodnocení exprese kaspázy 3 u oocytů ve stádiu metafáze I

Intenzita signálu kontrolních a experimentálních skupin oocytů je znázorněna na obrázku č. 6. Suma intenzity oocytů kultivovaných za přítomnosti 0,5 mM SAC poklesla oproti kontrolní skupině o 71,35 %. Příznak měření suma intenzity/ROI vykazoval pokles oproti kontrolní skupině o 71,66 %. Byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi kontrolní a experimentální skupinou oocytů u příznaků suma intenzity a suma intenzity/ROI na hladině významnosti ($p < 0,05$).

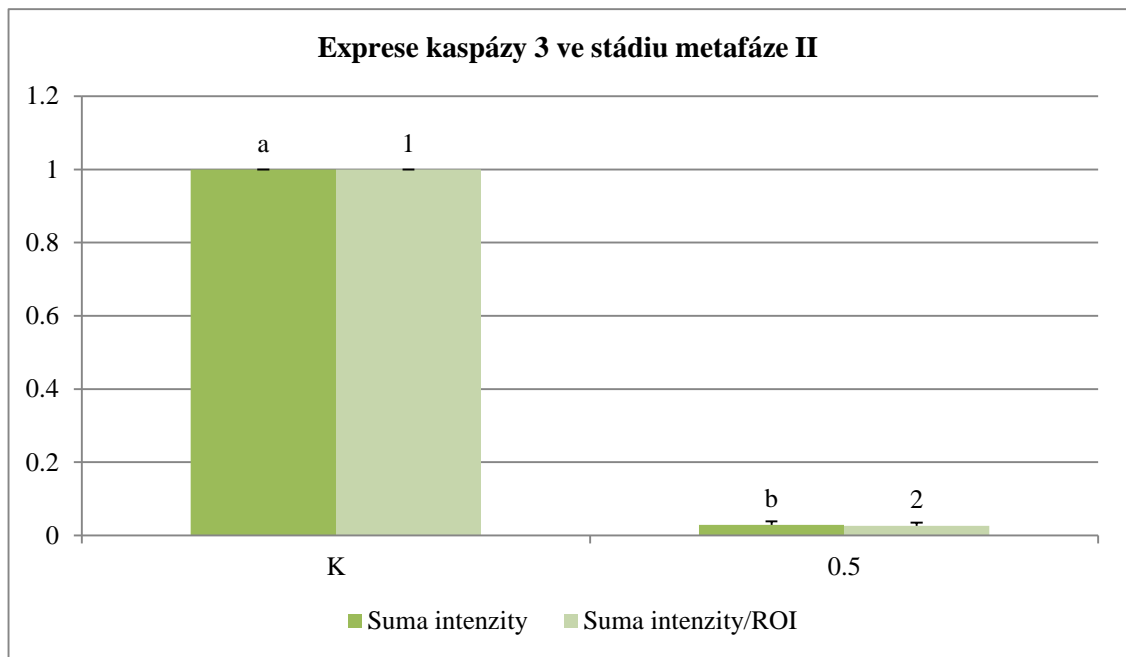


Obrázek 6: Expres kaspázy 3 po kultivaci za přítomnosti SAC (mM) u oocytů ve stádiu metafáze I

^{a,b,1,2} superskripty označují statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami oocytů jednotlivě pro každý příznak měření

5.3.2 Hodnocení exprese kaspázy 3 u oocytů ve stádiu metafáze II

Intenzita signálu kontrolní a experimentálních skupin oocytů ve stádiu metafáze II je znázorněna na obrázku č. 7. Suma intenzity skupiny oocytů kultivovaných při 0,5 mM SAC poklesla oproti kontrolní skupině o 97,12 %. Příznak měření suma intenzity/ROI vykazoval pokles oproti kontrolní skupině o 97,38 %. Intenzita signálu experimentální skupiny oocytů má se zvyšující koncentrací SAC klesající tendenci. Byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi kontrolní a experimentální skupinou oocytů u příznaků suma intenzity a suma intenzity/ROI na hladině významnosti ($p < 0,05$).



Obrázek 7: Expres kaspázy 3 po kultivaci za přítomnosti SAC (mM) u oocytů ve stádiu metafáze II

^{a,b,1,2} superskripty označují statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami oocytů jednotlivě pro každý příznak měření

6 Diskuze

V průběhu meiotického zrání oocytů *in vitro* dochází v důsledku vyjmutí oocytu z prostředí folikulární tekutiny ke snížení přirozené antioxidantivní ochrany oocytu (Shiotani *et al.*, 1991, Laloraya *et al.*, 1989). Následkem této situace dochází k zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species), která může vyústit ve stav zvaný oxidativní stres a negativně tak ovlivnit výslednou kvalitu oocytu a následně i embrya (Tarin, 1996, Tamura *et al.*, 2008, Tatemoto *et al.*, 2004, Miao *et al.*, 2009).

Regulační vliv SAC na produkci ROS somatických buněk je nesporný, jak dokazuje celá řada studií (Ide *et Lau*, 1999, Imai *et al.*, 1994, Prasad *et al.*, 1996, Rabinkov *et al.*, 2000, Sumioka *et al.*, 1998, Yang *et al.*, 2013). Vliv sirné sloučeniny česneku SAC byl zkoumán zejména v endoteliálních buňkách. Je známo, že oxidativní stres má vliv na vznik onemocnění, jako je například ateroskleróza. Svými antioxidantivními účinky v endoteliálních buňkách může SAC vznik této nemoci inhibovat (Ide *et Lau*, 1999). Vliv SAC na pohlavní buňky však zatím nebyl dostatečně prozkoumán.

Tato diplomová práce byla zaměřena na vliv sirných sloučenin česneku, konkrétně S-allylcysteinu na oxidativní stres v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách. Cílem bylo zjistit vliv SAC na jaderné zrání oocytů, produkci ROS a expresi štěpené formy kaspázy 3, jako markeru časné apoptózy v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů.

Dílčí experiment týkající se významu SAC v průběhu jaderného zrání měl za cíl zjistit, zda oocyty vystavené různým koncentracím SAC budou vykazovat nestandardní jaderné změny v průběhu meiotického zrání *in vitro*. U kontrolních a experimentálních skupin kultivovaných 24 hodin za přítomnosti SAC došlo k standardnímu průběhu zrání a metafáze I dosáhlo 91,68 – 95,24 % oocytů kontrolní i experimentálních skupin. Rozdíly mezi kontrolní a experimentálními skupinami nebyly statisticky významné. Po 48 hodinách *in vitro* kultivace dosáhlo 90,04 – 92,69 % oocytů kontrolní i experimentálních skupin stádia metafáze II, efekt SAC nebyl významný. Vliv SAC na průběh jaderného zrání u prasečích oocytů tedy nebyl prokázán. Ačkoliv SAC nemá vliv na jaderné zrání prasečích oocytů, jiné studie prokázaly vliv některých sirných sloučenin česneku na buněčný cyklus. Takovým příkladem může být anti-proliferativní účinek diallyldisulfidu na nádorové buňky, který je schopen inhibovat kinázovou aktivitu P34^{CDC2} (Knowles *et Milner*, 1998). Absence efektu SAC na průběh meiotického zrání může být vysvětlena cytoplazmatickými změnami oocytů, které se neprojevují morfologicky na tvaru chromatinu zrajícího oocytu.

Druhý experiment byl prováděn s cílem zjistit, zda jednotlivé koncentrace SAC mohou ovlivňovat produkci ROS v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů *in vitro*. Antioxidativní efekt SAC je způsoben přítomností thiolové skupiny –SH, která eliminuje negativní účinky silně reaktivních volných elektronových párů ROS. Tímto způsobem dochází k neutralizaci ROS a snížení jejich reaktivity (Colín-González *et al.*, 2012).

Experimenty bylo zjištěno, že suma intenzity signálu DCHFDA, látky s afinitou k ROS, u oocytů ve stádiu metafáze I byla nejvyšší v případě kontrolní skupiny, která byla kultivována v čistém kultivačním médiu bez přídavku SAC. Naopak nejnižší suma intenzity DCHFDA byla při kultivaci v koncentraci 1 mM SAC. Experimentální skupiny oocytů kultivované za přítomnosti třech různých koncentrací SAC se od sebe navzájem statisticky nelišily. Oocyty ve stádiu metafáze II vykazovaly také nejvyšší sumu intenzity signálu DCHFDA u kontrolní skupiny oocytů a nejnižší při koncentraci 1 mM SAC. Oproti oocytům ve stádiu metafáze I se však v tomto případě mezi sebou statisticky lišily oocyty jednotlivých experimentálních skupin. Oocyty kultivované za přítomnosti 0,1 mM SAC vykazovaly statisticky odlišnou produkci ROS než oocyty kultivované za přítomnosti 0,5 mM SAC a 1 mM SAC. Produkce ROS při zvyšující se koncentraci SAC klesá. Tento experiment jednoznačně prokázal, že SAC má pozitivní vliv na redukci ROS v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách. Tato zjištění jsou v souladu s dříve publikovanými pracemi (Imai *et al.*, 1994, Prasad *et al.*, 1996, Sumioka *et al.*, 1998, Ide *et al.*, 1999, Rabinkov *et al.*, 2000, Yang *et al.*, 2013). Antioxidativní účinky SAC ve své studii prokázal Yang *et al.* (2013), který potvrdil vliv SAC na redukci ROS a jeho podíl na nápravě erektilní dysfunkce způsobené oxidativním stresem u potkanů. Antioxidativní efekt SAC byl také prokázán u bovinních endoteliálních buněk a myších makrofágů (Ide *et al.*, 1999). Bylo prokázáno, že SAC snižuje oxidaci lipidů a formování peroxynitritu (Numagami *et al.*, 1995).

Na základě výsledků tohoto experimentu bylo také patrné, že rozdíl mezi oocyty kontrolní a experimentální skupiny byl vyšší u oocytů ve stádiu metafáze II. V průběhu *in vitro* kultivace je oocyt v laboratorních podmínkách vystaven řadě vlivů, jež zvyšují riziko vzniku oxidativního stresu. Mezi tyto faktory patří například působení světla, vysoké koncentrace kyslíku nebo přítomnost xenobiotik (Guérin *et al.*, 2001). Řada těchto vlivů může být odpovědná za vyšší náchylnost oocytů kultivovaných 48 hodin v podmínkách *in vitro* k nežádoucí produkci ROS.

Cílem třetího experimentu bylo zjistit, zda má SAC vliv na expresi markeru časné apoptózy – štěpené formy kaspázy 3. Při použití 0,5 mM SAC u oocytů v metafázi I došlo k poklesu signálu u obou příznaků měření. Podobná situace nastala i u oocytů ve stádiu metafáze II, kdy byl také zjištěn vliv 0,5 mM SAC na expresi štěpené formy kaspázy 3. I v tomto případě byl zjištěn pokles příznaků měření. U oocytů ve stádiu metafáze I i metafáze II byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi kontrolní a experimentální skupinou oocytů. Podle těchto výsledků je tedy patrné, že koncentrace 0,5 mM SAC má vliv na snížení exprese štěpené formy kaspázy 3.

Kaspáza 3 je látka, která se vyskytuje v časných stádiích apoptózy. Bylo dokázáno, že ROS se významným způsobem podílí na aktivaci kaspázy 9, která je iniciační látkou pro aktivaci kaspázy 3 (Kim *et al.*, 2003). Na základě této skutečnosti můžeme předpokládat, že se produkce ROS v průběhu meiotického zrání podílí na vzniku signálních kaskád, jejichž finálním výsledkem je programovaná buněčná smrt, která je v případě reprodukčních biotechnologií velice nežádoucím stavem. Skutečnost, že redukce ROS může odvrátit riziko apoptózy byla potvrzena u studie zaměřené na oxidativní stres granulózních buněk. Tato práce prokázala, že redukce hladin ROS za pomoci genisteinu způsobuje snížení exprese efektorové kaspázy 3 a kaspázy 4 (Zhang *et al.*, 2013).

Předložená práce dává do souvislosti meiotické zrání, produkci ROS a expresi kaspázy 3 ve zrajícím prasečím oocyty. Další experimenty jsou plánovány s ohledem na vývojovou schopnost těchto oocytů a úspěšnost časného embryonálního vývoje po oplození *in vitro*.

7 Závěr

Výsledky experimentů provedených v rámci předkládané diplomové práce potvrdily hypotézu, že sirné sloučeniny česneku snižují hladiny ROS a umožňují tak předcházet vzniku oxidativního stresu, který negativně ovlivňuje výsledky meiotického zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách. Tato skutečnost by mohla v budoucnu přispět k využívání SAC pro optimalizaci kultivačních médií používaných při meiotickém zrání oocytů *in vitro*.

Meiotické zrání je klíčovým dějem v procesu oogeneze, jeho adekvátní regulace je rozhodující pro vznik plnohodnotného a oplození schopného oocytu. Meiotické zrání v *in vitro* podmínkách je čteně využíváno pro biotechnologické postupy, jako je *in vitro* oplození a transgeneze. *In vitro* zrání je však negativně zatíženo oxidativním stresem vznikajícím v důsledku nefyziologických hladin reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species). Velkým zájmem vědeckých týmů je tak zabránit nadměrné tvorbě ROS, ochránit oocyt před oxidativním stresem a zvýšit úspěšnost *in vitro* zrání oocytů.

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda má S-allylcystein (SAC) vliv na jaderné zrání, produkci ROS a expresi štěpené formy kaspázy 3 u prasečích oocytů v průběhu meiotického zrání *in vitro*. V této diplomové práci nebyl prokázán statisticky významný vliv SAC na jaderné zrání prasečích oocytů. Byl však poprvé prokázán redukční vliv SAC na produkci ROS v průběhu meiotického zrání. Při kultivaci oocytů za přítomnosti SAC došlo ke snížení produkce reaktivních forem kyslíku až o 99,95 %. SAC se tak může stát snadno dostupnou látkou, která může v průběhu *in vitro* meiotického zrání zabraňovat vzniku oxidativního stresu. V této práci byl také prokázán vliv SAC na expresi štěpené formy kaspázy 3, která je významným markerem časné apoptózy. Je zřejmé, že SAC se významným způsobem podílí prostřednictvím snížení hladin ROS v průběhu meiotického zrání *in vitro* na inhibici signálních drah, nutných pro zahájení programované buněčné smrti.

Budoucí experimenty jsou užitečné pro prokázání vlivu sirných sloučenin česneku na časný embryonální vývoj oocytů, které dozrály *in vitro* v jejich přítomnosti. Příznivé ovlivnění vývojové kompetence během meiotického zrání oocytů pomůže dalšímu rozvoji technik asistované reprodukce.

8 Seznam literatury

Amagase, H. 2006. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *The Journal of Nutrition*. 136 (3). 716-725.

Anderson, E., Albertini, D. F. 1976. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *The Journal of Cell Biology*. 71 (2). 680-686.

Attaran, M., Pasqualotto, E., Falcone, T., Goldberg, J. M., Miller, K. F., Agarwal, A., Sharma, R. K. 2000. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in-vitro fertilization. *International Journal of Fertility and Women's Medicine*. 45 (5). 314-320.

Balasenthil, S., Arivazhagan, S., Ramachandran, C. R., Nagini, S. 1998. Effects of garlic on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster bucal pouch carcinogenesis. *Cancer Detection and Prevention*. 23 (6). 534-538.

Ballinger, S. W., Patterson, C., Yan, C. N., Doan, R., Burow, D. L., Young, C. G., Yakes, F. M., Van Houten, B., Ballinger, C. A., Freeman, B. A., Runge, M. S. 2000. Hydrogen peroxide - and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circulation Research*. 86 (9). 960-966.

Banerjee, S. K., Maulik, M., Manchanda, S. C., Dinda, A. K., Das, T. K., Maulik, S. K. 2001. Garlic-induced alteration in rat liver and kidney morphology and associated changes in endogenous antioxidant status. *Food and Chemical Toxicology*. 39 (8). 793-797.

Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., Freeman, B. A. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87 (4). 1620-1624.

Brace, L. D. 2002. Cardiovascular benefits of garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Cardiovascular Nursing*. 16 (4). 33-49.

Brodnitz, M. H., Pascale, J. V., Van Derslice, L. 1971. Flavor components of garlic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 19 (2). 273-275.

Cadenas, E., Davies, K. J. A. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 29 (3). 222-230.

Cohen, J., Alikani, M., Troubridge, J., Rosenwaks, Z. 1992. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Human Reproduction*. 7 (5). 685-691.

Colín-González, A. L., Santana, R. A., Silva-Islas, C. A., Chánez-Cárdenas, M. E., Santamaría, A., Maldonado, P. D. 2012. The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract and S-allylcysteine-induced protection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012. 1-16.

Conti, M., Andersen, C. B., Richard, F., Mehats, C., Chun, S. Y., Horner, K., Jin, C., Tsafiriri, A. 2002. Role of cyclic nucleotide signalling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 187 (1-2). 153-159.

Cox, D. A., Cohen, M. L. 1996. Effects of oxidized low density lipoproteins on vascular contraction and relaxation: clinical and pharmacological implications in atherosclerosis. *Pharmacological Reviews*. 48 (1). 3-19.

Crews, C. M., Erikson, R. L. 1992. Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast byr 1 gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89 (17). 8205-8209.

de Vantéry, C., Gavin, A. C., Vassalli, J. D., Schorderet-Slatkine, S. 1996. An accumulation of p34 cdc2 at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. *Developmental Biology*. 174 (2). 335-344.

Dekel, N. 1995. Molecular control of meiosis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 6 (5). 165-169.

Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodrigues, H. 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*. 32 (11). 1102-1115.

Dröge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 82 (1). 47-95.

Dunphy, W. G., Kumagai, A. 1991. The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell*. 67 (1). 189-196.

Dwivedi, C., John, L. M., Schmidt, D. S., Engineer, F. N. 1998. Effects of oil-soluble organosulfur compounds from garlic on doxorubicin-induced lipid peroxidation. *Anti-cancer Drugs*. 9 (3). 291-294.

Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122 (6). 829-838.

Erickson, G. F., Sorensen, R. A. 1974. In vitro maturation of mouse oocytes isolated from late, middle, and pre-antral graafian follicles. *Journal of Experimental Zoology*. 190 (1). 123-127.

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

Fan, H. Y., Sun, Q. Y. 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*. 70 (3). 535-547.

Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., Navarro, P. A. A. S. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 71 (5). 836-848.

Fleischauer, A. T., Poole, C., Arab, L. 2000. Garlic consumption and cancer prevention: Meta-analyses of colorectal and stomach cancers. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 72 (4). 1047-1052.

Freeman, F., Kodera, Y. 1995. Garlic chemistry: Stability of S-(2-propenyl)-2-propene-1-sulfinothioate (allicin) in blood, solvents, and stimulated physiological fluids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43 (9). 2332-2338.

Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 247 (1). 1-11.

Fujimoto, T., Miyayama, Y., Fuyuta, M. 1977. Origin, migration and fine morphology of human primordial germ-cells. *Anatomical Record*. 188 (3). 315-329.

Furuno, N., Nishizawa, M., Okazaki, K., Tanaka, H., Iwashita, J., Nakajo, N., Ogawa, Y., Sagata, N. 1994. Suppression of DNA - replication via Mos function during meiotic divisions in *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal*. 13 (10). 2399-2410.

Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F., Kirschner, M. W. 1991. Cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34 cdc2. *Cell*. 67 (1). 197-211.

Geng, Z., Lau, B. H. S. 1997. Aged garlic extract modulates glutathione redox cycle and superoxide dismutase activity in vascular endothelial cells. *Phytotherapy Research*. 11 (1). 54-56.

Germain, E., Auger, J., Ginies, C., Siess, M. H., Teyssier, C. 2002. In vivo metabolism of diallyl disulphide in the rat: Identification of two new metabolites. *Xenobiotica*. 32 (12). 1127-1138.

Ginsburg, M., Snow, M. H. L., McLaren, A. 1990. Primordial germ cells in the mouse during gastrulation. *Development*. 110 (2). 521-528.

Gosden, R. G. 1995. Oocyte development throughout life. In: Grudzinskas, J. G., Yovich, J. L. (Eds.), *Gametes – The Oocyte*. Cambridge University Press. Cambridge. p. 23-53. ISBN: 978-0521479950.

Gosden, R. G., Bownes, M. 1995. Cellular and molecular aspects of oocyte development. In: Grudzinskas, J. G., Yovich, J. L. (Eds.). *Gametes - The Oocyte*. Cambridge University Press. Cambridge. p. 23-53. ISBN: 978-0521479950.

Guérin, P., El Mouatassim, S., Menezo, Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*. 7 (2). 175-189.

Guo, Z., Muller, D., Pentz, R., Kress, G., Siegers, C. P. 1990. Bioavailability of sulphur-containing ingredients of garlic in the rat. *Planta Medica*. 56. 692-699.

Guthrie, H. D., Garrett, W. M. 2001. Apoptosis during folliculogenesis in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 58. 17-29.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press. Oxford. p. 888. ISBN: 978-0-19-856869-8.

Hashimoto, N., Kishimoto, T. 1988. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Developmental Biology*. 126 (2). 242-252.

Hatch, K. R., Capco, D. G. 2001. Colocalization of CaM KII and MAP kinase on architectural elements of the mouse egg: potentiation of MAP kinase activity by CAM KII. *Molecular Reproduction Development*. 58 (1). 69-77.

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

Challier, B., Perarnau, J. M., Viel, J. F. 1998. Garlic, onion and cereal fibre as protective factors for breast cancer: a French case-control study. *European Journal of Epidemiology*. 14 (8). 737-747.

Chaube, S. K., Prasad, P. V., Thakur, S. C., Shrivastav, T. G. 2005. Hydrogen peroxide modulates meiotic cell cycle and induces morphological features characteristic of apoptosis in rat oocytes cultured in vitro. *Apoptosis*. 10 (4). 863-874.

Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 61 (2). 192-208.

Chiquoine, A. D. 1954. The identification, origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anatomical Record*. 118 (2). 135-146.

Chittezhath, M., Kuttan, G. 2006. Radioprotective activity of naturally occurring organosulfur compounds. *Tumori*. 92 (2). 163-169.

Iciek, M., Kwiecień, I., Wlodek, L. 2009. Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 50 (3). 247-265.

Ide, N., Lau, B. H. 1999. Aged garlic extract attenuates intracellular oxidative stress. *Phytomedicine*. 6 (2). 125-131.

Ide, N., Lau, B. H. 2001. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor κ B activation. *The Journal of Nutrition*. 131 (3). 1020-1026.

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

Inoue, M., Naito, K., Aoki, F., Toyoda, Y., Sato, E. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote*. 3 (3). 265-271.

Inoue, M., Naito, K., Nakayama, T., Sato, E. 1998. Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 58 (1). 130-136.

Inoue, M., Sato, E. F., Nishikawa, M., Park, A. M., Kira, Y., Imada, I., Utsumi, K. 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry*. 10 (23). 2495-2505.

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

Jandke, J., Spiteller, G. 1987. Unusual conjugates in biological profiles originating from consumption of onions and garlic. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 421. 1-8.

Jozwik, M., Wolczynski, S., Jozwik, M., Szamatowicz, M. 1999. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Molecular Human Reproduction*. 5 (5). 409-413.

Kamata, H., Hirata, H. 1999. Redox regulation of cellular signalling. *Cellular Signalling*. 1 (1). 1-14.

Keizer, J., Li, Y. X., Stojilković, S., Rinzel, J. 1995. InsP₃ induced Ca²⁺ excitability of the endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell*. 6 (8). 945-951.

- Kim, J. Y., Park, J. H. 2003. ROS-dependent caspase-9 activation in hypoxic cell death. *FEBS letters*. 549 (1). 94-98.
- Kishimoto, T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology*. 15 (6). 654-663.
- Knowles, L. M., Milner, J. A. 1998. Depressed p34^{cdc2} kinase activity and G₂/M phase arrest induced by diallyl disulfide in HCT-15 cells. *Nutrition and Cancer*. 30. 169-174.
- Kubiak, J. Z., Weber, M., De Pennart, H., Winston, N. J., Maro, B. 1993. The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *The EMBO Journal*. 12 (10). 2131-3778.
- Laloraya, M., Kumar, G. P., Laloraya, M. M. 1989. Histochemical study of superoxide dismutase in the ovary of the rat during the estrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*. 86 (2). 583-587.
- Lau, B. H. S. 2001. Suppression of LDL oxidation by garlic. *The Journal of Nutrition*. 131 (3). 985-988.
- Lawson, L. D., Wang, Z. J. 2005. Allicin and allicin-derived garlic compounds increase breath acetone through allyl methyl sulfide: Use in measuring allicin bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (6). 1974-1983.
- Lee, J., Miyano, T., Moor, R. M. 2000. Localization of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote*. 8 (2). 119-125.
- Lorca, T., Cruzalegui, F. H., Fesquet, D., Cavadore, J., Mery, J., Means, A., Doree, M. 1993. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*. 366. 270-273.
- Lucas, X., Martínez, E. A., Roca, J., Vázquez, J. M., Gil, M. A., Pastor, L. M., Alabart, J. L. 2002. Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology*. 58 (5). 871-885.
- Lykkesfeldt, J., Svendsen, O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*. 173 (3). 502-511.

Marchal, R., Vigneron, C., Perreau, C., Bali-Papp, A., Mermilood, P. 2002. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*. 57 (5). 1523-1532.

Mariani, E., Polidori, M. C., Cherubini, A., Mecocci, P. 2005. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *Journal of Chromatography B*. 827 (1). 65-75.

Mates, J. M., Perez-Gomez, C., De Castro, I. N. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. 32 (8). 595-603.

McCord, J. M., Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*. 244 (22). 6049-6055.

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

Mehlmann, L. M. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*. 130 (6). 791-799.

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

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

Molyneaux, K., Wylie, Ch. 2004. Primordial germ cell migration. *International Journal of Developmental Biology*. 48 (5-6). 537-544.

Monaghan, P., Metcalfe, N. B., Torres, R. 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters*. 12 (1). 75-92.

Mostafa, M. G., Mima, T., Ohnishi, S. T., Mori, K. 2000. S-allylcysteine ameliorates doxorubicin toxicity in the heart and liver in mice. *Planta medica*. 66 (2). 148-151.

Motlik, J., Fulka, J. 1976. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Zoology*. 198 (2). 155-162.

Motlik, J., Fulka, J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. 25 (1). 87-96.

Murray, A. W., Solomon, M. J., Kirschner, M. W. 1989. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature*. 339 (6222). 280-286.

Niwa, K. 1993. Effectiveness of in vitro maturation and in vitro fertilization techniques in pig. *Journal of Reproduction and Fertility*. 48. 49-59.

Numagami, Y., Sato, S., Ohnishi, S. T. 1996. Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as antioxidants. *Neurochemistry International*. 29 (2). 135-143.

Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*. 344 (6266). 503-508.

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

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

Pincus, G., Enzmann, E. V. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro I. The activation of ovarian eggs. *The Journal of Experimental Medicine*. 62 (5). 665-675.

Prasad, K., Laxdal, V. A., Yu, M., Raney, B. L. 1995. Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 148 (2). 183-189.

Prasad, K., Laxdal, V. A., Yu, M., Raney, B. L. 1996. Evaluation of hydroxyl radical-scavenging property of garlic. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 154 (1). 55-63.

Rabinkov, A., Miron, T., Mirelman, D., Wilchek, M., Glozman, S., Yavin, E., Weiner, L. 2000. S-Allylmercaptogluthathione: the reaction product of allicin with glutathione possesses SH-modifying and antioxidant properties. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1499 (1). 144-153.

Romanovský, A., Činčerová, A., Čížek, F., Dvořák, P., Kaprálek, F., Kubišta, V., Nedvídek, J., Opatrný, Z., Pazourek, J., Pikálek, P., Sefert, J., Slavíková, Z., Váňa, J., Závada, V. 1988. *Obecná biologie 2*. SPN. Praha. 695 s.

Sadler, T. W. 2011. *Langmanova lékařská embryologie*. Grada Publishing. Praha. 432 s. ISBN: 978-80-247-2640-3.

Shimada, M., Terada, T. 2002. Roles of cAMP in regulation of both MAP kinase and p34(cdc2) kinase activity during meiotic progression, especially beyond the MI stage. *Molecular Reproduction and Development*. 62 (1). 124-131.

Shiotani, M., Noda, Y., Narimoto, K., Imai, K., Takahide, M., Fujimoto, K., Ogawa, K. 1991. Immunohistochemical localization of superoxide-dismutase in the human ovary. *Human Reproduction*. 6 (10). 1349-1353.

Shkolnik, K., Tadmor, A., Ben-Dor, S., Nevo, N., Galiani, D., Dekel, N. 2011. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108 (4). 1462-1467.

Shoubridge, E. A., Wai, T. 2007. Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. *Current topics in Developmental Biology*. 77. 87-111.

Smith, M. A., Rottkamp, C. A., Nunomura, A., Raina, A. K., Perry, G. 2000. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. 1502 (1). 139-144.

Soyal, S. M., Amleh, A., Dean, J. 2000. Fig α , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle development. *Development*. 127 (21). 4645-4654.

Steinmetz, K. A., Kushi, L. H., Bostick, R. M., Folsom, A. R., Potter, J. D. 1994. Vegetables, fruit, and colon cancer in the Iowa women's health study. *American Journal of Epidemiology*. 139 (1). 1-15.

Stojkovic, M., Machado, S. A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Goncalves, P. B., Wolf, E. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content in bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biology of Reproduction*. 64 (3). 904-909.

Stojkovic, M., Motlik, J., Kölle, S., Zakhartchenko, V., Alberio, R., Sinowatz, F., Wolf, E. 1999. Cell-Cycle Control and Oocyte Maturation: Review of Literature. *Reproduction in Domestic Animals*. 34 (3-4). 335-342.

Sumioka, I., Matura, T., Kasuga, S., Itakura, Y., Yamada, K. 1998. Mechanisms of protection by S-allylmercaptocysteine against acetaminophen-induced liver injury in mice. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 78 (2). 199-207.

Sun, Q. Y., Breitbart, H., Schatten, H. 1999. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reproduction, Fertility and Development*. 11 (8). 443-450.

Sun, Q. Y., Nagai, T. 2003. Molecular Mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development*. 49 (5). 347-359.

Takagi, J., Araki, Y., Dobashi, M., Imai, Y., Hiroi, M., Tonosaki, A., Sendo, F. 1989. The development of porcine zona pellucida using monoclonal antibodies: I. Immunohistochemistry and Light Microscopy. *Biology of Reproduction*. 40 (5). 1095-1102.

Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Sugino, N. 2008. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*. 44 (3). 280-287.

Tarin, J. J. 1996. Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Molecular Human Reproduction*. 2 (10). 717-724.

Tatemoto, H., Muto, N., Sunagawa, I., Shinjo, A., Nakada, T. 2004. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in-vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biology of Reproduction*. 71 (4). 1150-1157.

- Thibault, C., Szöllösi, D., Gérard, M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reproduction Nutrition Développement*. 27 (5). 865-896.
- Toyokuni, S., Sagripanti, J. L. 1994. Increased 8-hydroxydeoxyguanosine in kidney and liver of rats continuously exposed to copper. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 126 (1). 91-97.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., Telser, J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 266 (1-2). 37-56.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 160 (1). 1-40.
- Van Blerkom, J., Runner, M. N. 1984. Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. *American Journal of Anatomy*. 171 (3). 335-355.
- Van den Hurk, R., Bevers, M. M., Beckers, J. F. 1997. In-vivo and in-vitro development of preantral follicles. *Theriogenology*. 47 (1). 73-82.
- Van den Hurk, R., Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63 (6). 1717-1751.
- Verhlaac, M. H., Kubiak, J. Z., Weber, M., Géraud, G., Colledge, W. H., Evans, M. J., Maro, B. 1996. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development*. 122 (3). 815-822.
- Voronina, E., Wessel, G. M. 2003. The Regulation of oocyte maturation. *Current Topics in Developmental Biology*. 58. 53-110.
- Wassarman, P. M. 1988. Zona pellucida glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry*. 57 (1). 415-442.
- Wassarman, P. M., Albertini, D. F. 1994. The mammalian ovum. In: Knobil, E., Neill, J. D. (eds.). *The physiology of reproduction*. 2nd ed. Raven Press. New York. p. 79-122. ISBN: 978-078100863.

- Wassarman, P. M., Josefowicz, W. J. 1978. Oocyte development in the mouse: an ultrastructural comparison of oocytes isolated at different stages of growth and meiotic competence. *Journal of Morphology*. 156 (2). 209-236.
- Wehrend, A., Meinecke, B. 1998. The meiotic cell cycle in oocytes of domestic animals. *Reproduction in Domestic Animals*. 33 (3-4). 289-297.
- Wei, Z., Lau, B. H. 1998. Garlic inhibits free radical generation and augments antioxidant enzyme activity in vascular endothelial cells. *Nutrition Research*. 18 (1). 61-70.
- Whitaker, M. 1996. Control of meiotic arrest. *Reviews of Reproduction*. 1 (2). 127-135.
- Wright, C. S., Becker, D. L., Lin, J. S., Warner, A. E., Hardy, K. 2001. Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation. *Reproduction*. 121 (1). 77-88.
- Yang, J., Wang, T., Yang, J., Rao, K., Zhan, Y., Chen, R. B., Liu, Z., Li, M. C., Zhuan, L., Zang, G. H., Guo, S. M., Xu, H., Wang, S. G., Liu, J. H., Ye, Z. Q. 2013. S-allyl cysteine restores erectile function through inhibition of reactive oxygen species generation in diabetic rats. *Andrology*. 1 (3). 487-494.
- Yi, Y. J., Sutovsky, M., Song, W. H., Sutovsky, P. 2014. Protein deubiquitination during oocyte maturation influences sperm function during fertilisation, antipolyspermy defense and embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*. (n.d.).
- Zhang, J. M., Wang, H. C., Wang, H. X., Ruan, L. H., Zhang, Y. M., Li, J. T., Tian, S., Zhang, Y. C. 2013. Oxidative stress and activities of caspase-8, -9, and -3 are involved in cryopreservation-induced apoptosis in granulosa cells. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 166 (1). 52-55.
- Zhao, X., Singh, B., Batten, B. E. 1991. The role of c-mos proto-oncoprotein in mammalian meiotic maturation. *Oncogene*. 6 (1). 43-49.