

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních  
zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Vliv sirných sloučenin česneku na meiotické  
zrání prasečích oocytů**

**Diplomová práce**

Autor práce: Bc. Andrea Písaříková

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

2015

## **Čestné prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci na téma „Vliv sirných sloučenin česneku na meiotické zrání prasečích oocytů“ vypracovala samostatně a použila jsem pouze pramenů, které cituji a uvádím v příloženém seznamu literatury.

V Praze dne 8. 4. 2015

---

## **Poděkování**

Děkuji Ing. Janu Nevoralovi, Ph.D., vedoucímu mé diplomové práce, za trpělivost a odborné vedení diplomové práce a Ing. Markétě Dvořákové za cenné konzultace a pomoc při získávání výsledků. Ráda bych zde poděkovala i mé rodině a přátelům vstřícnost a podporu v době studia a psaní diplomové práce.

## Souhrn

Rozvoj reprodukčních biotechnologií vyžaduje získávat dostatečný počet kvalitních oocytů. Kvalita oocytů je závislá na úspěšném meiotickém zrání, během něhož dochází k množství změn. Tyto změny zahrnují kumulární expanzi kumulo – oocytárního komplexu (COCs), která předurčuje úspěšnost meiotického zrání. Meiotické zrání oocytů a kumulární expanze jsou komplexně regulovány. Dojde – li v *in vitro* podmínkách k narušení rovnováhy mezi regulačními faktory, dochází k nežádoucím změnám a k poklesu úspěšnosti zrání oocytů. Častou příčinou zhoršení kvality oocytů zrajících *in vitro* je oxidační stres. Použití antioxidantů je jedním ze způsobů, jak negativní projevy oxidačního stresu potlačit. Mezi intenzivně studované sloučeniny s antioxidačním účinkem patří sirné sloučeniny česneku. Na základě dostupných informací jsme stanovili hypotézu, že sirné sloučeniny uvolňující se z česneku působí pozitivně na průběh meiotického zrání prasečích oocytů v podmínkách *in vitro*.

Prasečí oocyty byly získávány aspirací z ovárií prasnic. Vybrané oocyty byly kultivovány po dobu 24 a 48 hodin. Experimentální skupina oocytů byla kultivována v médiu obohaceném o přírodní látku uvolňující se z česneku – S-allyl cystein. Po uplynutí příslušné doby bylo hodnoceno stádium meiotického zrání a intenzita kumulární expanze podle množství hyaluronové kyseliny.

Experimenty prokázaly, že S-allyl cystein neovlivňuje průběh meiotického zrání prasečích oocytů. Analýza produkce hyaluronové kyseliny prokázala stimulační efekt S-allyl cysteinu na intenzitu kumulární expanze po 24 hod. kultivace *in vitro*. Na základě získaných výsledků je možné předpokládat, že S-allyl cystein ovlivňuje kultivaci COCs v podmínkách *in vitro*. Pro hodnocení vlivu S-allyl cysteinu na časný embryonální vývoj takto ošetřených oocytů jsou zapotřebí další studie.

Klíčová slova: prasečí oocyt, meiotické zrání, kumulární expanze, sirné sloučeniny česneku, S-allyl cystein

## Summary

Reproductive biotechnologies development requires getting enough quantity of quality oocytes. Quality of oocytes depends on successful meiotic maturation, oocytes undergo many changes during this process. These changes include cumulus expansion of cumulus – oocyte complexes (COCs) determining the success of meiotic maturation. Oocyte maturation and cumulus expansion are comprehensively regulated. Disruption of regulating factors balance in oocytes maturing *in vitro* leads to undesired changes and less success of oocyte maturation. The important reason of decreasing quality of oocytes maturing *in vitro* is oxidation stress. Using of antioxidants is one of the possibilities how to decrease negative demonstrations of oxidation stress. Among intensively studied compounds with antioxidative impact belongs garlic sulphur compounds. Based on the best knowledge we hypothesised, positive effect of garlic sulphur compounds on meiotic maturation of pig oocytes *in vitro*.

Pig oocytes were obtained by aspiration from prepubertal gilts ovaries. Selected oocytes were cultivated for 24 and 48 hours. Experimental group of oocytes was cultivated in medium enriched of natural substances released from garlic – S-allyl cysteine. The stage of meiotic maturation and amount of hyaluronic acid for oocyte evaluation and cumulus expansion measurement were analysed.

The experiments showed that S-allyl cystein is not changing meiotic maturation of pig oocytes. Analysis of hyaluronic acid production proved stimuli effect of S-allyl cysteine on cumulus expansion intensity after 24 hours cultivation *in vitro*. Our results suggest S-allyl cysteine positive effect on COCs cultivated *in vitro*. Following studies are required for early embryonic development evaluation of after fertilization of S-allyl cysteine treated oocytes.

Key words: pig oocyte, meiotic maturation, cumulus expansion, garlic sulphur compounds, S-allyl cystein

## Obsah

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2 VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>8</b>
<b>3 LITERÁRNÍ REŠERŠE</b> .....	<b>9</b>
3.1. OOGENEZE .....	9
3.1.1. Fáze množení.....	9
3.1.2. Fáze růstu.....	10
3.1.3. Fáze zrání.....	11
3.2. KUMULÁRNÍ EXPANZE .....	12
3.3. FAKTORY REGULUJÍCÍ MEIOTICKÉ ZRÁNÍ OOCYTŮ .....	13
3.3.1. Cyklické nukleotidy .....	13
3.3.2. <i>M-phase maturation promoting factor</i> .....	14
3.3.3. Mitogeny aktivovaná protein kináza .....	14
3.3.4. Vápníkové ionty .....	15
3.3.5. Gasotransmitery .....	15
3.4. ROD <i>ALLIUM</i> .....	18
3.4.1. Česnek kuchyňský ( <i>Allium sativum</i> ) .....	18
3.5. SÍRNÉ SLOUČENINY ČESNEKU .....	20
3.5.1. <i>Alliin</i> .....	20
3.5.2. <i>Allicin</i> .....	20
3.5.3. <i>Monosulfid a polysulfidy česneku</i> .....	22
3.5.4. <i>Ajoen</i> .....	22
3.6. METABOLISMUS BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK ČESNEKU .....	23
3.7. VLV ČESNEKU NA ORGANISMUS .....	25
3.7.1. <i>Oxidativní stres</i> .....	27
<b>4 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>28</b>
4.1. ZÍSKÁVÁNÍ A KULTIVACE PRASEČÍCH KUMULO-OOCYTÁRNÍCH KOMPLEXŮ .....	28
4.2. HODNOCENÍ STÁDIA JADERNÉHO ZRÁNÍ.....	29
4.3. MĚŘENÍ PRODUKCE HYALURONOVÉ KYSELINY .....	29
4.4. STATISTICKÁ ANALÝZA .....	30
<b>5 VÝSLEDKY</b> .....	<b>31</b>
5.1 VLV S-ALLYL CYSTEINU NA PRŮBĚH MEIOTICKÉHO ZRÁNÍ PO 24 H V <i>IN VITRO</i> PODMÍNKÁCH .....	31
5.2 VLV S-ALLYL CYSTEINU NA PRŮBĚH MEIOTICKÉHO ZRÁNÍ PO 48 H V <i>IN VITRO</i> PODMÍNKÁCH .....	31
5.3 VLV S-ALLYL CYSTEINU NA KUMULÁRNÍ EXPANZI PO 24 HODINÁCH V <i>IN VITRO</i> PODMÍNKÁCH .....	32
<b>6 DISKUZE</b> .....	<b>35</b>
<b>7 ZÁVĚR</b> .....	<b>38</b>
<b>8 SEZNAM LITERATURY</b> .....	<b>39</b>
<b>9 SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY</b> .....	<b>61</b>

# 1 Úvod

Reprodukční biotechnologie jsou pro zvyšování kvality chovu a šlechtění hospodářských zvířat v dnešní době nezbytné. Aby bylo možné zvýšit úspěšnost inseminace, *in vitro* oplození, embryotransferu nebo klonování, je třeba intenzivního studia procesů, které ovlivňují meiotického zrání oocytů. Jako vhodné experimentální modely se pro svou četnost a podobnost s lidskými oocyty ukazují prasečí oocyty. Výsledky experimentů mohou být tedy přínosem nejen v oblasti reprodukce hospodářských zvířat, ale i v oblasti humánní.

S meiotickým zráním úzce souvisí proces kumulární expanze, kdy kumulární buňky produkují extracelulární matrix bohatou na hyaluronovou kyselinu (HA). Následně dochází k přerušení spojů mezi oocytem a kumulárními buňkami. Jelikož má kumulární expanze vliv nejen na ovulaci a úspěšné oplození, ale především na meiotické zrání oocytů, lze ji využít jako ukazatel průběhu meiotického zrání v podmínkách *in vitro*. Meiotické zrání oocytů a jejich výsledná kvalita je ovlivněna mnoha vzájemně propojenými faktory. Během procesu meiotického zrání oocytů dochází k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species), které jsou příčinou vzniku oxidativního stresu a ovlivňují tak meiotického zrání *in vitro*. Snížení hladiny ROS pozitivně ovlivňuje úspěšnost kultivace oocytů.

Sírné sloučeniny, obsažené v česneku, disponují schopností pozitivně ovlivňovat zdravotní stav organismu. Prokázány byly například účinky antiseptické, antiparazitické, antimykotické, antibakteriální, antikoagulační a dále byl prokázán vliv na snižování oxidativního stresu v buňkách. Bližší zkoumání biologicky aktivních látek v česneku a mechanismy jejich působení, by mohly být aplikovatelné nejen v reprodukčních biotechnologiích zvířat ale i v lidské asistované, neboť plnohodnotné meiotické zrání je klíčové pro vznik kvalitních oplození schopných oocytů.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Na základě současně dostupných poznatků předpokládáme, že sirné sloučeniny obsažené v česneku jsou schopné pozitivně ovlivňovat průběh meiotického zrání prasečích oocytů v podmínkách *in vitro*.

Cílem této diplomové práce je ověřit hypotézu, že přírodní látky uvolňující se z česneku mohou v podmínkách *in vitro* zasahovat do regulace meiotického zrání prasečích oocytů.



## **3 Literární rešerše**

### **3.1. Oogeneze**

#### **3.1.1. Fáze množení**

Oogeneze je proces přeměny primordiálních zárodečných buněk (PGCs – primordial germ cells) ve vajíčka. PGCs byly donedávna považovány za jediný zdroj pohlavních buněk dospělého jedince (Wassarman, 1988, Yanagimachi, 1988), nyní se ale objevují studie prováděné na myších, které naznačují existenci nových mitoticky aktivních zárodečných buněk ve vaječnicích dospělých samic (Johnson *et al.*, 2004). PGCs jsou velké buňky kulovitěho tvaru, které se rychle dělí a obsahují poměrně malé množství organel v cytoplazmě (Makabe *et al.*, 1989). Primordiální zárodečné buňky mají mimogonadální původ a vznikají během embryonálního vývoje ve žlutkovém váčku, odtud nejprve pasivním pohybem migrují do kaudálního prvostřeva (Fujimoto *et al.*, 1977) a dále aktivně do dvou genitálních lišt (Chiquoine, 1954, Sadler, 2011). Plazmatická membrána vytváří pseudopodia, v cytoplazmě se koncentrují mikrotubuly a mikrofilamenta (Fujimoto *et al.*, 1977) a buňky jsou schopny aktivního améboidního pohybu (Makabe *et al.*, 1989). PGCs jsou během svého přesunu naváděny chemotaxí somatických buněk (Yanagimachi, 1988, Makabe *et al.*, 1991). V pohybu hrají patrně úlohu i komponenty extracelulární matrix (Fujimoto *et al.*, 1985) v nichž dochází ke změnám v distribuci glykoproteinů, kolagenu a fibronektinu (GarciaCastro *et al.*, 1997). Mezi významné mediátory přesunů PGCs patří integriny (Anderson *et al.*, 1999) a kadheriny (Bendel – Stenzel *et al.*, 2000). Přesun PGCs do oblasti budoucích gonád je podnětem k diferenciaci vaječníků a dále k nástupu folikulogeneze (Wartenberg, 1989).

Zárodečné buňky se v místě budoucích vaječníků dostávají do styku se somatickými buňkami, které tvoří základ granulózy budoucího folikulu a jsou pro následné meiotické dělení nepostradatelné (Wassarman, 1988; Vanderhyden, 2002). Mitoticky vzniklé oogonie zahajují meiotické dělení ještě v prenatálním období života samice a vstupují do profáze I. V této fázi se z oogonií stávají oocyty I. řádu (Wassarman, 1988). Meiotické dělení je ve stádiu diplotene profáze I zastaveno a pokračuje až po dosažení puberty (Wassarman, 1988).

### **3.1.2. Fáze růstu**

Během této fáze oogeneze jsou oocyty metabolicky vysoce aktivní a několikanásobně zvětší svůj objem. Nedochozí však jen ke změnám kvantitativním ale i ke změnám kvalitativním. Dochází ke změnám v uspořádání jádra, zvyšuje se počet organel – především mitochondrií, které procházejí přeměnou tvaru, velikosti i struktury (Wassarman, 1988, Makabe *et al.*, 1992). V důsledku zvýšené aktivity jádra a jadérka narůstá i množství ribozómů. S rostoucím objemem cytoplazmy oocyty ale jejich koncentrace klesá. Během fáze růstu oocyty probíhá syntéza a příjem molekul, které jsou určené nejen pro růst, vývoj a zrání oocytů ale slouží především jako úložiště informací a zásob potřebných pro první období po oplodnění, kdy je embryonální genom ještě neaktivní (Picton *et al.*, 1998). Oocyty získávají během fáze růstu meiotickou kompetenci, což je schopnost podstoupit jaderné zrání, jako nezbytný předpoklad vzniku plnohodnotného oocyty schopného oplození (Hurk *et Zhao*, 2005). Za meioticky kompetentní lze považovat pouze ty oocyty, které dosáhly min 80% velikosti vyvinutého oocyty (Wassarman, 1988).

Současně s růstem oocyty dochází k procesu folikulogeneze – vývoje folikulu a diferenciaci jeho struktur. Dochází k tomu díky zvýšenému množství a změně tvaru granulózních buněk. Vaječníky samic jsou po narození osídleny primordiálními folikuly tvořenými primárními oocyty obklopenými jednou vrstvou složenou ze 4 – 8 plochých pregranulózních buněk (Wassarman, 1988). V průběhu růstu folikulu dochází ke změnám tvaru granulózních buněk z plochého na kubický. Granulózní buňky proliferují a vzniká tak primární folikul, který je tvořen oocytem obklopeným vrstvou 11 – 20 granulózních buněk kubického tvaru (Hulshof *et al.*, 1992, Hurk *et Zhao*, 2005). Pokud je oocyt obklopen více než dvěma vrstvami folikulárních buněk, hovoříme již o tzv. sekundárním folikulu (Driancourt, 1991). V této fázi folikulogeneze podstupují oocyty nejrozsáhlejší změny. Mezi oocytem a folikulárními buňkami dochází k tvorbě komponentů *zony pellucidy* (Wassarman, 1988). *Zona pellucida* je tenká membrána složená z glykoproteinů ZP1, ZP2 a ZP3, která tvoří ochrannou vrstvu kolem oocyty. Vznik a růst sekundárních folikulů je nezávislý na působení FSH (Folikuly stimulující hormon), neboť jak potvrdili Fortune *et Eppig* (1979), dochází k jejich vývoji i bez hormonů. Folikuly se však již v této době stávají vnímavé k folikulo – stimulujícímu hormonu. U rostoucích oocytů probíhá natolik intenzivní syntéza RNA, že dojde k vytvoření většiny RNA, kterou zralý oocyt nakonec obsahuje (Wassarman *et Albertini*, 1994).

Formování dutiny ( antra), která je vyplněná tekutinou, je charakteristické pro antrální folikuly, někdy označované též jako terciální folikuly (Driancourt, 1991). V této fázi dochází k proliferaci a diferenciaci granulózních buněk v theca interna a theca externa. Na buňkách *theca interna* se objevují receptory pro luteinizační hormon (LH) (Xu *et al.*, 1995). Dochází k tvorbě bazální membrány, k vaskularizaci folikulu a zvýšení propustnosti krevních cév. Tyto děje vedou ke zvýšení velikosti antrálního folikulu (Hurk *et Zhao*, 2005). Oocyty časných terciálních folikulů jsou dosud rostoucí a transkripčně aktivní (Crozet *et al.*, 1986) čímž dochází k hromadění mRNA, ribozomů a peptidů (Pavlok *et al.*, 1992). Zrání oocyty může pokračovat až po prasknutí folikulu a ovulaci oocyty (Yanagimachi, 1988).

### **3.1.3. Fáze zrání**

Během této fáze se plně dorostlý, meioticky kompetentní oocyt přemění v oplození schopný oocyt (Motlik *et al.*, 1986). Fáze meiotického zrání je proces, při kterém nejprve v průběhu meiózy I (heterotypické dělení) zredukuje zárodečné diploidní buňky počet chromozomů na polovinu a v meióze II (homeotypické dělení) vzniknou haploidní gamety (Eppig, 1993, Kishimoto, 2003, Mehlmann, 2005). Meióza I přechází plynule v druhé dělení – meiózu II a to bez replikace DNA. Do meiózy II tedy gamety vstupují s poloviční sadou chromozómů. Meióza se pozastavuje ve 2. bloku v metafázi II, čímž je ukončen proces meiotického zrání (Wassarman, 1988). Oocyt v metafázi II může dokončit proces meiózy jedině tehdy, pokud je aktivován penetrací spermie nebo partenogenetickou aktivací. K přeměně dochází těsně před ovulací v důsledku změn v hladinách gonadotropních hormonů. Pouze oocyty, které dokončily meiotické zrání, jsou schopné oplození a mohou se po splnutí se spermií vyvíjet (Wassarman *et Albertini*, 1994).

Jádro oocyty se před započítím meiotického zrání nachází ve fázi zárodečného váčku (GV – germinal vesicle). Po zvýšení hladiny LH dochází k rozpadu doposud neporušené jaderné membrány a je tak zahájeno meiotické zrání. Tento proces je nazýván jako rozpad zárodečného váčku (GVBD – germinal vesicle breakdown). V současné době je uznáváno rozdělení stádií GV na základě kondenzace chromatinu a změn jaderné membrány oocytů do 5 tříd (GV0 – GV4). Fáze GV0 je typická rozptýleným chromatinem a viditelným jádrem s jadernou membránou. Ve fázi GV1 je jaderná membrána i jádérko neporušené a dochází ke kondenzaci chromatinu za vytvoření struktury připomínající prstenec. Ve fázi GV2 dochází k tvorbě shluků chromatinu poblíž jaderné membrány (Sun *et al.*, 2004). Ve fázi GV3 se chromatinové shluky rozptýlí po celé nukleoplazmě. Ve fázi GV4 není již jaderná membrána zřetelná a jádérko zcela mizí (Guthrie *et Garrett*, 2000).

## **3.2. Kumulární expanze**

Savší oocyt je v Graafově folikulu těsně obklopen kompaktním obalem kumulárních buněk vejconosného hrbolku- *cumulus oophorus* a společně s oocytem tvoří tzv. kumulo-oocytární komplex (COC) (Dekel *et al.*, 1979). Kumulární buňky, těsně obklopující oocyt, vytvářejí mezibuněčné spoje typu *gap junction* a pomocí buněčných adhezních komplexů poskytují oocytu živiny a kontakt s vnějším prostředím (Eppig, 1991, Kidder *et Mhawi*, 2002). Během preovulační periody jsou ve folikulu prostřednictvím kumulárních buněk syntetizovány strukturální komponenty extracelulární matrix (ECM), která je tvořena proteiny (Nakayama *et al.*, 1996) a glykosaminoglykany (Mlynářčiková *et al.*, 2009). Nejvíce zastoupeným bezulfátovým glykosaminglykanem je kyselina hyaluronová (HA) (Nakayama *et al.*, 1996). HA jako signální molekula plní důležitou úlohu v regulaci meiotického zrání (Yokoo *et al.*, 2010) a kumulární expanze (Yokoo *et al.*, 2003). Dále byl prokázán její příznivý vliv na ovulaci (Hess *et al.*, 1999) i oplození oocyty (Chen *et al.*, 1993).

Důsledkem syntézy a ukládání ECM dochází k zvětšování celého COC a tento proces je označován jako kumulární expanze (Dekel *et al.*, 1979). Kumulární expanze je nezbytná pro meiotickou a vývojovou kompetenci (Qian *et al.*, 2003), úspěšné oplodnění a vývoj zygoty (Chen *et al.*, 1993). Podle Qian *et al.* (2003) úzce souvisí intenzita kumulární expanze s *in vitro* zráním oocyty a pro dosažení co nejvyšší úspěšnosti meiotického zrání v podmínkách *in vitro* je tedy žádoucí vybírat pouze takové oocyty, které mají kompaktní obal kumulárních buněk (Sun *et Nagai*, 2003). V průběhu meiotického zrání dochází k řadě morfologických změn kumulárních buněk, které jsou dle Šutovský *et al.* (1994) pro kumulární expanzi nepostradatelné. V důsledku syntézy ECM a s tím spojenou rostoucí vzdáleností mezi kumulárními buňkami dochází během kumulární expanze k přerušení spojů *gap junction*. Výsledkem je zastavení přenosu nízko-molekulárních látek, jako např. – cAMP a cGMP, čímž je umožněno znovuzahájení meiotického zrání (Chen *et al.*, 1990, Šutovský *et al.*, 1994).

Endokrinní regulace kumulární expanze je v podmínkách *in vivo* závislá na působení gonadotropních hormonů (FSH, LH) (Dekel *et al.*, 1979, Eppig, 1980, Motlík *et al.*, 1998). Významnou úlohu v regulaci kumulární expanze představuje preovulační vlna LH. Preovulační vlna LH působí na proteázy v granulóznicích buňkách (Wassarman, 1988), které aktivují růstový diferenciační faktor 9 (GDF-9). Aktivovaný GDF-9 vyvolává sekreci hyaluronové kyseliny (Elvin *et al.*, 1999).

Kumulární expanze není regulována pouze na úrovni hormonální, ale byl prokázán i metabolický vliv oocyty. Eppig *et al.* (1993) publikovali práci, v níž dokazují, že oocyt během meiotického zrání produkuje faktor podporující kumulární expanzi (CEEF), jehož přítomnost je pro kumulární expanzi u myši nezbytná (Buccione *et al.*, 1990). Vliv CEEF na kumulární expanzi je pravděpodobně druhově specifický nebož jak dokazuje Procházka *et al.* (1998), u prasečích oocytů probíhá kumulární expanze i bez přítomnosti tohoto faktoru. V regulaci kumulární expanze se dále uplatňuje např.: epidermální růstový faktor (EGF – Epidermal Growth Factor), růstový faktor podobný inzulinu (IGF – Insulin – like growth factor) (Němcová *et al.*, 2007).

Jelikož kumulární expanze závisí na obsahu HA v expandovaném kumulu (Dekel *et al.*, 1979), lze tuto hodnotu užít jako ukazatel intenzity kumulární expanze (Němcová *et al.*, 2007, Nagyová, 2012).

### **3.3. Faktory regulující meiotické zrání oocytů**

Meiotické zrání je proces, v jehož regulaci se uplatňují signální dráhy malých a jednoduchých molekul stejně jako proteinů a multienzymových komplexů. Tyto biochemické změny vedou k tvorbě oplození schopného oocyty a následujícího embryonálního vývoje.

#### **3.3.1. Cyklické nukleotidy**

Mezi cyklické nukleotidy, které významně zasahují do meiotického zrání oocytů, patří cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) a cyklický guanosinmonofosfát (cGMP). Molekuly cAMP i cGMP jsou produkovány kumulárními buňkami oocytů, ze kterých jsou syntetizovány dvěma enzymy adenylátcyklázou a guanylátcyklázou (Dekel, 1988). Organismy cyklické nukleotidy využívají jako tzv. druhé posly v řadě signálních drah. Působí tak obvykle jako aktivátor proteinkináz. Proteinkinázy A – PAK v případě cAMP, které následně fosforylují další enzymy a na základě toho je buď aktivují či deaktivují. Cyklický AMP aktivací PKA blokuje spontánní zahájení meiózy a udržuje tak oocyt v meiotickém bloku (Chen *et al.*, 2009). K aktivaci PKA dochází navázáním cAMP na jednu z regulačních podjednotek a změnou konformace. Pro znovuzahájení meiózy je tedy nutné, aby došlo ke snížení hladiny cAMP (Cho *et al.*, 1974, Bornslaeger *et al.*, 1986). Cyklický AMP je syntetizován ve folikulárních buňkách oocyty v závislosti na LH vlnách a do oocyty se dostává mezibuněčnými spoji – typu gap junctions (Cho *et al.*, 1974).

Vliv cGMP na zrání oocytů nebyl doposud zcela objasněn. Koncentrace cGMP klesá v závislosti na zrání oocyty. Působením hypofyzárních hormonů – konkrétně působením luteinizačního hormonu (LH), dochází ke snížení hladiny cGMP. U myši je po poklesu cGMP možné, aby oocyt znovuzahájil meiózu (Vacari, 2009). Jiná práce, ve které byli pro pokus vyrány prasečí oocyty ovšem dokazuje, že pro znovuzahájení meiózy je zapotřebí, aby došlo ke zvýšení hladiny cGMP (Hubbard *et Price*, 1988). Cyklický GMP může prostřednictvím inhibice cAMP fosfodiesterázy zvýšit hladinu cyklického AMP a udržet tak oocyt v meiotickém bloku (Ratner, 1976).

### **3.3.2. M – fázi podporující faktor**

M – fázi podporující faktor (MPF – maturation promoting factor) má významnou úlohu v procesu regulace meiotického zrání oocyty i při mitotickém dělení somatických buněk (Li *et al.*, 2013). MPF je komplex, který se skládá ze dvou podjednotek. Cyklin B jako regulační podjednotky a CDK1 jako katalytické podjednotky. U savců je intracelulární množství CDK1 a cyklinu B jedním z důležitých faktorů, který udržuje oocyt v profázi prvního meiotického dělení. V průběhu růstové fáze oocyty je komplex přítomen ale díky inhibici fosforylace Threoninu 14 a tyrosinu 15 je katalyticky neaktivní (Ferrell *et al.*, 1991, Gordo *et al.*, 2001, Tunquist *et Maller*, 2003). Tento komplex označovaný jako pre-MPF je aktivní až za přítomnosti fosfatázy CDC25. Během buněčného cyklu je hladina CDK1 stálá. Jednou z možností regulace MPF je tedy ovlivnění hladiny cyklinu B (Stojkovic *et al.*, 1999).

### **3.3.3. Mitogeny aktivovaná protein kináza**

Mitogeny aktivovaná protein kináza (MAPK) je serin/treonin protein-kináza regulující buněčnou proliferaci, která se dále podílí na uzavírání spojů typu gap junctions (Norris *et al.*, 2008). Mitogeny aktivovaná protein kináza (MAPK) je spolu s MPF aktivována na počátku fáze zrání, kde se podílí na regulaci meiózy (Fan *et al.*, 2002). MAPK zůstává aktivní po celou dobu fáze zrání, a její aktivita zůstává konstantní i přes kolísající aktivitu MPF (Hunter, 2000). Narozdíl od MPF, je aktivace MAPK v průběhu meiotického zrání druhově specifická. V oocytech velkých domácích zvířat se MAPK aktivuje současně nebo těsně po GVBD, u oocytů myši se aktivuje až po GVBD (Hurk *et Zhao*, 2005) a u žab rodu *Xenopus* byla MAPK dokonce aktivovaná již před GVBD. Během meiotického zrání je MAPK potřebná nejen pro zabezpečení činnosti MPF (pozitivní zpětnou vazbou translaci cyklinu B pomáhá při aktivaci MPF v oocytech), ale také pro formování dělicího vřeténka a udržení druhého meiotického bloku (Hurk *et Zhao*, 2004). V druhém meiotickém bloku

jeaktivita MAPK vysoká. Tím je potlačena degradace cyklinu B a nedochází tak ke snížení aktivity MPF. Po splnutí oocyty a spermie dochází k inaktivaci MAPK (Ito *et* Kashiwazaki, 2012).

### **3.3.4. Vápníkové ionty**

Hlavní zásobárnou vápníkových iontů je endoplazmatické retikulum (Cha *et* Chian, 1998). V prasečích oocytech se hlavní depozitum  $\text{Ca}^{2+}$  iontů nachází v karyoplazmě, mitochondriích, vakuolách a lipidových granulách (Petr *et al.*, 2001). Pro uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  iontů je zapotřebí otevření  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů. V tomto procesu hrají důležitou roli dva typy receptorů: inositoltrifosfátové (IP3) a ryanodinové (RYR) (Cha *et* Chian, 1998).

Intracelulárním vazebným proteinem pro  $\text{Ca}^{2+}$  je kalmodulin. Kalmodulin se nachází v cytosolu a při navázání  $\text{Ca}^{2+}$  iontů dochází ke změně konformace. Touto změnou konformace dochází k aktivaci kalmodulin dependentní proteinkinázy (CaMKII) (Alberts, 1998).

Významnou roli hraje vápník i při regulaci meiotického dělení a po oplození. Díky zvýšení hladiny volných vápníkových iontů v cytosolu oocyty dojde k obnovení pozastaveného procesu meiotického dělení a dále i k vydělení prvního pólového tělíska v MI fázi (Cha *et* Chian, 1998). Po tom, co dojde k penetraci spermie, vzroste hladina  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a následně se aktivuje CaMKII (Schmidt *et al.*, 2006). Aktivace CaMKII je podnětem k poměrně rychlé depolarizaci plazmatické membrány, která je pojistkou před polyspermií. Zvýšená hladina vápníkových iontů je podnětem pro ukončení MII fáze, dojde k vydělení druhého pólového tělíska a oocyt vstoupí do fáze časného embryonálního vývoje (Tunguist *et* Maller, 2003).

### **3.3.5. Gasotransmitery**

Jak publikovali Wu *et* Wang (2005) a Wang (2002) jsou gasotransmitery molekuly plynů, s malou molární hmotností, které mohou volně procházet cytoplazmatickou membránou a působit v buňkách jako signální molekuly. Díky jejich velikosti nevyžaduje signalizace gasotransmitery membránové receptory, které by napomohly přenosu z extracelulárního do intracelulárního prostředí (Zhao *et al.*, 2001, Pae *et al.*, 2009). Gasotransmitery jsou endogenně uvolňovány podle aktuálních potřeb organismu a nejsou tedy nikde hromaděny. Uvolňování gasotransmiterů je zprostředkováno enzymy z aminokyselin. Po uvolnění jsou však gasotransmitery velmi rychle degradovány a to během několika minut nebo dokonce sekund (Wang, 2002). Účinek gasotransmiterů na buňky může být

zprostředkován tzv. druhým poslem. Mezi doposud známé gasotransmitery patří: oxid dusnatý (NO), oxid uhelnatý (CO) a sulfan (H<sub>2</sub>S).

### **Oxid dusnatý**

Gastrotransmitter oxid dusnatý je syntetizován syntázou oxidu dusnatého (NOS), která se v organismu vyskytuje ve třech izofotech: indukovatelná NOS (iNOS), endoteliální NOS (eNOS) a nervová NOS (nNOS). Zatímco v oocytech byla prokázána přítomnost mRNA všech tří izoformů NOS, v kumulárních buňkách byla detekována mRNA pouze izoformem eNOS a iNOS (Chmelíková *et al.*, 2010). Oxid dusnatý (NO) působí v organismu jako signální molekula v cévní, svalové a reprodukční soustavě (Rosselli *et al.*, 1998). Oxid dusnatý má vliv na hormonální regulaci reprodukční soustavy u samců (McCann, 1982) i u samic (Van Voorhis *et al.*, 1995). V samičí reprodukční soustavě působí dále na kontraktilitu dělohy a udržení gravidity (Farina *et al.*, 2001). Byl prokázán účinek NO v regulaci meiotického zrání oocytů (Chmelíková *et al.*, 2010, Tichovská *et al.*, 2011). Během meiotického zrání je oxid dusnatý produkován kumulo – oocytárním komplexem (COC) a je nezbytný pro GVBD a dosažení MII (Chmelíková *et al.*, 2010). V oocytech hlodavců hraje NO významnou roli při rozpadu zárodečného váčku (GVBD) a v přechodu z anafáze do telofáze 1. meiotického dělení (Nakamura *et al.*, 2002). Chmelíková *et al.* (2010) dokazuje, že oxid dusnatý je v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů produkován COC a hraje důležitou roli pro GVBD a dosažení MII.

### **Oxid uhelnatý**

Oxid uhelnatý (CO) je jedovatý, bezbarvý plyn, bez detekovatelného zápachu a bez chuti. Oxid uhelnatý vzniká jako vedlejší produkt při štěpení hemu na biliverdin a Fe<sup>2+</sup>, za přítomnosti enzymu hemoxydázy (HO). HO je dle Tenhunen *et al.*, (1969) považována za hlavní endogenní zdroj CO v organismu. CO je schopen působit nejen jako neurotransmitter ale může hrát důležitou úlohu i v regulaci napětí cévního řečiště. CO způsobuje vazodilataci hladké svaloviny cév (André *et al.*, 2011) ale i vazokonstrikci jak popisuje Lamon *et al.*, (2009). CO má dále pozitivní účinky i co by proapoptotický faktor (Peyton *et al.*, 2002), prokázán byl i vliv na prevenci proti ateroskleróze (Mustafa *et al.*, 2009) nebo vliv proti shlukování krevních destiček v cévách (Wagner *et al.*, 1997). Studie, kterou publikovali Zenclussen *et al.* (2011) dokazuje, že HO jako prekurzor oxidu uhelnatého má vliv na ovulaci oplozeníšopných oocytů, tvorbu a udržení CL. Doposud ovšem nebyl



proveden výzkum vlivu HO či CO na meiotické zrání oocytů. Během březosti dochází ke změnám v expresi HO, které korelují s hladinou estrogenů a ovlivňují tak kontraktilitu myometria v období gravidity (Levytska *et al.*, 2013).

### **Sulfan**

H<sub>2</sub>S je prudce jedovatý (Reiffenstein, 1992), bezbarvý plyn štiplavého zápachu. Toxické účinky H<sub>2</sub>S se nejčastěji projevují v centrální nervové a dýchací soustavě (Stárka, 2010). Přírodním donorem sulfanu mohou být např.: sírné sloučeniny. Koncentrace sirovodíku endogenního původu se v tělních tekutinách a tkáních, pohybuje v desítkách až stovkách mikromolů. V těchto koncentracích sirovodík není toxický a plní významné fyziologické funkce. K endogenní produkci ve fyziologických koncentracích dochází uvolňováním z aminokyseliny L-cysteinu. Tvorba sulfanu je katalyzována třemi enzymy: cystathionin β-syntáza (CBS), cystathionin γ-lyáza (CSE) a 3 – mercaptopyruvát sulfotransferáza (3MPST) (Kamoun, 2004).

Wang (2002) publikoval výsledky, ze kterých vyplývá, že např v játrech a ledvinách, je nutná přítomnost enzymů CBS i CSE současně, aby mohlo dojít k uvolnění H<sub>2</sub>S. Naopak v nervové soustavě postačí přítomnost CBS a v kardiovaskulárním systému pouze CSE (Lim *et al.*, 2008).

Sulfan je v organismu rychle oxidován na síru, oxid siřičitý (SO<sub>2</sub>) a sulfáty, nebo může být přeměněn na hydrogensulfid a sírné ionty (Mancardi *et al.*, 2009).

H<sub>2</sub>S se ve vodě rozpouští, ale rozpustnost v lipofilních rozpouštědlech je přibližně pětkrát větší (Wang, 2002), což umožňuje snadnou difúzi přes buněčné membrány. Díky chemickým vlastnostem, prostupuje volně přes membrány a na cílové molekuly působí přímo, bez nutnosti přítomnosti receptorů a posílů (Zhao *et al.*, 2001).

Byl prokázán pozitivní účinek H<sub>2</sub>S na snižování krevního tlaku a kardioprotektivní účinek (Hu *et al.*, 2008, Tang *et al.*, 2010). Tým kanadských a amerických vědců dokazuje, že sirovodík působí jako vasorelaxant. Vasorelaxační účinek H<sub>2</sub>S není na rozdíl od NO nebo CO vyvoláván prostřednictvím aktivace cGMP (Calvert *et al.*, 2010) nýbrž prostřednictvím aktivací KATP kanálů v buňkách hladké svaloviny cév (Wang, 2003) nebo v endoteliálních buňkách prostřednictvím prostupu K<sup>+</sup> iontů do buňky (Zhao *et al.*, 2001). Sulfan také působí na regulaci toku dalších iontů, jako je Ca<sup>2+</sup> a Na<sup>+</sup> iontů, čímž dochází k ovlivňování membránového potenciálu buněk (Kelso *et al.*, 1992, Pan *et al.*, 2008). Hladina H<sub>2</sub>S ovlivňuje sekreci inzulínu a souvisí tak s obezitou a diabetem II. typu (Zhu *et al.*, 2011). Podle Tang *et al.* (2010) inhibuje sulfan sekreci inzulínu

v pankreatu  $\beta$ -buněk, působí protizánětlivě, analgeticky a má antiapoptotické účinky. Vzhledem k tomu, že se sulfan podílí na expresi řady antiapoptotických faktorů lze předpokládat, že ovlivňuje procesy spojené také s apoptózou oocytů (Calvert *et al.*, 2010, Elrod *et al.*, 2007). Přítomnost enzymů CBS a CSE byla zaznamenána v buňkách dělohy, vagíny, placenty a plodových obalů, kde sehraávají zatím neobjasněnou roli (Zhu *et al.*, 2011). Enzym CBS byl studován v myších oocytech, kde nebyla prokázána jeho přítomnost. Je však exprimován v kumulárních buňkách a hraje tedy pravděpodobně roli v průběhu zrání oocytu (Liang *et al.*, 2007). Na základě poznatků studie provedené na žábách rodu *Xenopus laevis* je možné předpokládat, že  $H_2S$  hraje v průběhu meiotického zrání oocytů roli při regulaci koncentrace cAMP (Kimura, 2000). Dle studie Nevorál *et al.* (2014) urychluje  $H_2S$  meiotické zrání prasečích oocytů a zvyšuje aktivitu MPF při rozpadu jaderné membrány (GVBD).

### **3.4. Rod *Allium***

Rod *Allium* je jedním z nejdůležitějších rodů čeledi *Amaryllidaceae*, řádu *Asparagales*, podtřídy *Liliaceae* (Fay *et Chase*, 1996, Takhtajan, 1997). Česnek je jednou z nejstarších kulturních rostlin, která je známá a využívána minimálně 5 000 let. Pochází ze Střední Asie (Malý *et Petříková*, 2000) dnes je rozšířený v mírných, suchých a polosuchých oblastech severní polokoule (Khedim *et al.*, 2013).

#### **3.4.1. Česnek kuchyňský (*Allium sativum*)**

Česnek kuchyňský je známý především jako velmi aromatická zelenina. Vytváří složenou cibuli tvořenou stroužky (Konvička, 1998). Je tvořen z 60-70 % z vody (Velíšek, 2002). Sušina je tvořena z deseti druhů sacharidů (fruktóza, glukóza, arabinóza, inulin), které tvoří přibližně 28 % česnekových palic. 2 % jsou tvořena z proteinů, 1,5% tvoří vláknina a pouze 0,15% hmotnosti zabírají aminokyseliny – konkrétní zastoupení jednotlivých aminokyselin je popsáno v příloze v tabulce č. 1.

V česneku se nachází přibližně 33 sloučenin síry, které jsou zodpovědné za řadu pozitivních účinků česneku na organismus (alliin, alicin, metiin, ajoen, propiin, allylpropyl disulfid, diallyl trisulfid, S-allylcystein, vinylditiin, S-allylmerkaptocystein) - jsou však důvodem štiplavé chuti a typického zápachu česneku (Kemper, 2000). Nezanedbatelný je i obsah vitaminů obsažených v česneku (A, B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, C, E a K). Jejich průměrné množství na 100g česneku je uvedeno v příloze v tabulce č. 2.

Kromě toho obsahuje česnek i množství minerálních látek (brom, fosfor, vápník, hliník, chlor, měď, železo, draslík, síra, jod, mangan, hořčík, zinek, germanium, telur, sodík). Česnek je navíc velmi významným zdrojem organického selenu (Ovesná *et al.*, 2003, Khedim *et al.*, 2013), který je známý v chovu zvířat svým vlivem na jejich úspěšnou reprodukci (Hostetler *et al.*, 2003). Pro přehlednost jsou množství minerálních látek uvedena v příloze v tabulce č. 3.

Velmi důležitou složku česneku tvoří i enzymy. Enzym alliináza degraduje sirné aminokyseliny česneku na další biologicky aktivní látky. Alliináza transformuje cystein sulfoxidy na thiosulfináty (Cavallito *et Bailey*, 1944). K uvolnění tohoto enzymu dochází, pokud jsou syrové stroužky česneku drceny, sekány, žvýkány nebo jinak narušeny. Optimální pH pro činnost allinázy je 6,5, proto je v kyselém prostředí žaludku neaktivní (Lawson *et Hughes*, 1992). Jak dokazuje i studie na myších Lachmann *et al.* (1994) po perorálním podání alliinů, byla jeho přítomnost detekována v žaludku, střevě a játrech, aniž by byl metabolizován.

Další důležité enzymy vyskytující se v česneku jsou peroxidáza, deoxyribonukleáza, invertáza, lipáza, lysozym, guanylátcykláza aj. (Konvička, 1998).

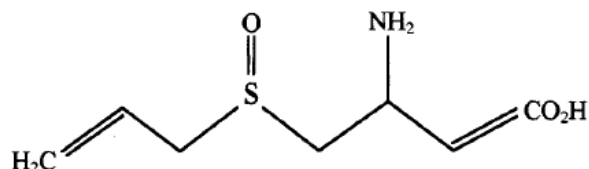
Česnek obsahuje dále flavonoidy (217.0 mg/kg) a jednoduché fenoly (Fenwick *et Hanley* 1985), které jsou přirozenou ochranou proti plísním, antioxidant, zvyšují využitelnost vitamínu C, čímž přispívají k obranyschopnosti, a dokonce u nich byly potvrzeny protinádorové účinky. Česnek obsahuje ovšem i steroidy a fytosteriny, které se spolu se saponiny podílí na toxických účincích česneku při jeho nadměrné konzumaci.

Obsah jednotlivých látek v česneku se velmi výrazně mění, a to v závislosti na odrůdě (Vodrážka *et al.*, 2013), původu, půdě, počasí, kdy se jedná zejména o závislost na teplotě a délce dne, dále se obsah látek liší v závislosti na vodním režimu, hnojení, ošetřování a uskladnění (Kvasnička, 2009).

### 3.5. Sírné sloučeniny česneku

Sírné sloučeniny jsou důležitou skupinou látek, které jsou sice poměrně nestálé, významně však ovlivňují aroma široké škály potravin (Konvička, 1998, Velíšek, 2002).

#### 3.5.1. Alliin

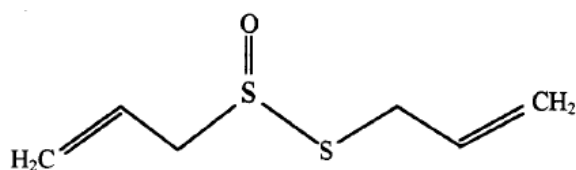


Obrázek 1: Strukturální vzorec alliinu (O’Gara et al, 2000)

S-allylcystein sulfoxid, triviálně označovaný jako alliin, je dle Konvičky (1998) nejdůležitější aminokyselinou česneku, protože se jedná o výchozí látku sírných vazeb. Jde o svazky jemných, bílých, nepáchnoucích jehliček, které jsou rozpustné ve vodě, nikoli v organických rozpouštědlech. Mnohé práce dokazují, že právě alliin je zodpovědný za antibiotické, baktericidní, bakteriostatické, mykostatické a fungicidní účinky česneku (Cavallito *et* Bailey, 1944, Konvička, 1998, Bulková 2011).

Analýza obsahu cystein sulfoxidů v několika vzorcích česneku ukázala, že genotypy se ve schopnosti jejich produkce za stejných podmínek liší (Ovesná *et al.*, 2003).

#### 3.5.2. Allicin

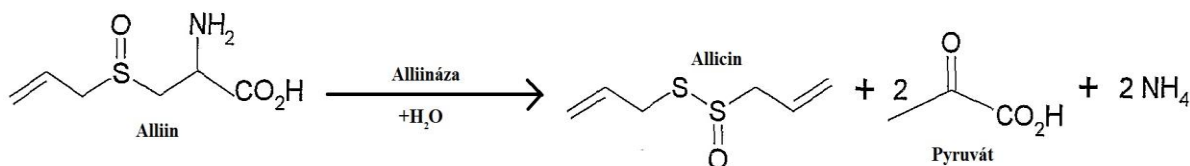


Obrázek 2: Strukturální vzorec allicinu (O’Gara et al, 2000)

Že je allicin součástí česneku, objevili Cavallito a Bailey (1944). Právě v té době bylo dokázáno, že je česnek velmi prospěšný jako antibiotikum k léčbě infekčních onemocnění. Objev allicinu v česneku byl natolik významný, že se jím začali zabývat i další vědci. Struktura allicinu, neboli diallylthiosulfonátu, je známa od roku 1947, kdy bylo prokázáno, že by mohl být syntetizován oxidací diallyl disulfidu (Koch *et* Lawson, 1996). Jde o těkavou látku nažloutlé barvy, vyznačující se štiplavou chutí a česnekovým zápachem (Block, 1985),

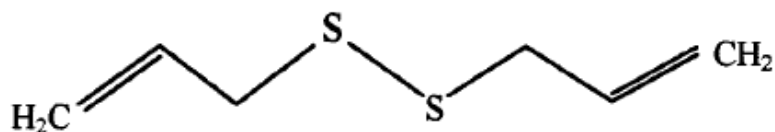
kteřá je ale velmi nestabilní (Lawson *et* Wang, 1993) a varem se rychle rozkládá. Během několika minut po aplikaci do krve již nemůže být detekován (Freeman *et* Kodera 1995) a po požití syrového česneku nebo čistého allicinu nelze jeho přítomnost zjistit v krvi ani moči (Lawson *et* Hughes., 1992). Ačkoliv bylo prokázáno, že se jedná o účinný antimikrobiální prostředek v *in vitro* podmínkách, jeho účinky v podmínkách *in vivo* jsou diskutabilní. Nedávné studie ukazují, že biologická dostupnost allicinu je poměrně špatná (Lawson *et* Hughes., 1992). Tato zjištění ukazují, že allicin v *in vivo* podmínkách nemůže přímo přispívat k pozitivním účinkům česneku. Allicin v organismu velmi rychle reaguje s cysteinem a glutationem (Rabinkov *et al.*, 2000), přičemž produkty těchto reakcí působí jako antioxidanty. Allicin může dále S-thiolací ovlivnit aktivitu celé řady proteinů, které obsahují thiolovou skupinu. S-thiolace ovlivňuje intracelulární signalizaci a je pokládána za jeden z antioxidačních mechanismů (Pinto *et al.*, 2006). Díky chemické nestabilitě nemůže být allicin zodpovědný za nežádoucí vedlejší účinky konzumace česneku, jako jsou například poruchy trávení (Desai *et al.* 1990, Nakagawa *et al.* 1980) a alergické reakce (Lybarger *et al.*, 1982).

V palicích česneku se allicin za běžných podmínek nenalézá, protože vzniká až vlivem působení enzymu alliinázy na alliin (Ellmore *et* Feldberg, 1994), jak je znázorněno na obrázku č. 3.



**Obrázek 3: Vznik Alicinu (upraveno dle Josling, 2004)**

### 3.5.3. Monosulfid a polysulfidy česneku



**Obrázek 4: Strukturní vzorec diallyl disulfidu (O’Gara et al, 2000)**

Monosulfid a polysulfidy česneku jsou sirné sloučeniny, které vznikají rozkladem allicinu. Diallyl sulfid (DAS) a polysulfidy - diallyl disulfid (DADS) a diallyl trisulfid (DATS) jsou rozpustné v tucích, způsobují nepříjemný zápach a další charakteristické organoleptické vlastnosti česneku (Konvička, 1998). DAS a polysulfidy, obsažené v česneku zvyšují aktivitu antioxidantních enzymů a tím chrání buňky před oxidativním stresem (Fukao *et al.*, 2004). Polysulfidy česneku zvyšují produkci reaktivních forem kyslíku (ROS- Reactive Oxygen Species) v nádorových buňkách. To může vést ke zvýšenému oxidativnímu stresu a k aktivaci dráhy c- Jun N-terminální kináza, které spouští apoptózu v nádorových buňkách neuroblastomu (Filomeni *et al.*, 2003). Tento efekt sirných sloučenin česneku je výrazný u nádorových buněk právě proto, že obsahují pouze malé množství antioxidantů (Xiao *et al.*, 2004). DADS způsobuje zvýšenou expresi proapoptotických faktorů a sníženou expresi antiapoptotických faktorů v nádorových buňkách mléčné žlázy (Nakagawa *et al.*, 2001). DADS dále zvyšuje intracelulární hladinu vápenatých iontů (Park *et al.*, 2002). Prostřednictvím posttranslačních modifikací histonů ovlivňuje DADS expresi celé řady genů kódujících proteiny, které hrají roli v regulaci buněčného cyklu, jako například kinázy p21 a MAPK3, inhibitorů DNA-vázajících proteinů nebo proteinů účastnících se opravy poškozené DNA (Druesne-Pecollo *et al.*, 2007).

### 3.5.4. Ajoen

Ajoen, jako jeden z rozkladných produktů Alicinu, byl objeven roku 1984. Jeho systematický název je 4, 5, 9 – trithiododeka - 1, 6, 11 – trien – 9 - oxid. Vyskytuje se především v olejových extraktech česneku (Konvička, 1998). Jak naznačují výsledky studie z roku 1992 má ajoen větší antivirový účinek než allicin (Tatarinstev, 1992) a hraje důležitější roli i v antikoagulačních mechanismech (Block *et al.*, 1984, Rendu *et al.*, 1989, Apitzcastro *et al.*, 1992). Ajoen může být odpovědný za zastavení buněčného cyklu v G2 fázi

(Xu *et al.*, 2004) a dále je schopen snižovat hladinu antiapoptotických faktorů v buňce (Li *et al.*, 2002).

### **3.6. Metabolismus biologicky aktivních látek česneku**

Metabolismus látek, které jsou obsaženy v česneku, není doposud zcela prozkoumán. Mnohé studie se přeměnami sírných sloučenin sice zabývají, ale detekují jednotlivé meziprodukty především ve vydechovaném vzduchu. Mnohem užitečnější by proto byly studie zabývající se přítomností těchto látek např. v krvi, neboť takové výsledky by dokazovaly dostupnost pro jednotlivé tkáně.

Česnek obsahuje velké množství sírných sloučenin, které jsou chemickými reakcemi přeměňovány na další produkty (Amagase *et al.*, 2001). Neporušený česnek obsahuje gama-glutamylcystein, který vstupuje jako výchozí látka do dvou reakcí.

1) Hydrolýzou a následnou oxidací je přeměněn na S-alk(en)yl sulfoxidy, mezi které řadíme i alliin (S-allylcystein sulfoxid).

2) Dlouhodobou extrakcí dochází k přeměně na sírnou aminokyselinu S-allylcystein a to působením enzymu gama-glutamyltranspeptidázy (Amagase, 2006, Corzo-Martinez *et al.*, 2007).

Pokud dojde k porušení nebo dehydrataci česnekových palic, je alliin přeměněn účinkem enzymu allinázy na kyselinu sulfonovou, pyruvát a amoniak (Amagase, 2006). K této velmi rychlé přeměně (v řádu několika sekund) dochází až při porušení buněk česneku (Block, 1985), protože alliin a enzym allináza se nachází ve stroužku odděleně. Pokud tedy nedojde k poškození buněk a setkání alliinu s příslušným enzymem, je česnek bez zápachu (Koch, *et Lawson*, 1996). Enzym allináza je přítomna prakticky ve všech druzích rodu *Allium*.

Z kyseliny sulfonové vzniká allicin (diallyl thiosulfínát) (Lanzotti, 2006). Allicin je přeměňován na DAS, DADS a DATS. Studie naznačují, že polysulfidy jsou zřejmě odpovědné za pozitivní účinky česneku (Freeman *et Kodera*, 1995). V nepolárním prostředí se z allicinu tvoří vinylthiiny a může být přeměněn i na další sírné sloučeniny jako např.: ajoen (Apitzcastro *et al.*, 1983). Podle Block *et al.* (1984) k tomu dochází S-thiolací allicinu.

Allicin je v organismu vázán na mastné kyseliny a proteiny v membránách a je tedy vycytán dřív, než je vstřebán do krve (Freeman *et Kodera*, 1995). Jak dokazují Lawson

*et Wang (2005)*, allicin a polysulfidy jsou v organismu metabolizovány a vzniká allylmerkaptan, který je dále metylován na allyl methylsulfid. Allyl metylsulfid je hlavním metabolitem allicinu a je přítomen ve vydechovaném vzduchu po konzumaci česneku.

## **Vyzrálý česnekový extrakt**

Zpracovaný česnek obsahuje řadu dalších sirných sloučenin, které se přirozeně v česneku nevyskytují (*Fenwick et Hanley 1985, Lawson et Wang, 1993*). Během dlouhodobé extrakce dochází k přeměně gama-glutamylcysteinu na S-allyl cystein (SAC) (*Colin – Gonzalez et al., 2012*). SAC je stabilní sirná aminokyselina krystalické podoby bez barvy a zápachu (*Kodera et al., 2002*).

I když existuje mnoho komerčně vyráběných doplňků stravy obsahujících česnek, spadají v podstatě do jedné ze čtyř kategorií:

1. dehydrovaný česnekový prášek
2. česnekový olej
3. česnekový olej macerát
4. vyzrálý česnekový extrakt (AGE)

Nejčastější formou, ve které je česnek podáván, je kromě čerstvého česneku, vyzrálý česnekový extrakt (AGE). Obě formy vykazují antioxidační aktivitu, nicméně AGE se zdá být účinnější. Při zkoumání pozitivního či negativního vlivu česneku, např. na hladinu cholesterolu v krvi, se mnohé studie ve svých výsledcích liší. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že forma v jaké je česnek podán hraje v organismu klíčovou roli (*Amagase, 2014*).

Dosavadní výzkumy ukazují, že vyzrálý česnekový extrakt je hodnotnějším zdrojem látek než syrový česnek. AGE vzniká dlouhodobou extrakcí česnekových palic v 15-20% etanolu, kvůli čemuž pak obsahuje méně allicinu než čerstvý česnek, ale jak uvádí *Amagase (2006)* obsahuje více S-allylcysteinu (SAC). Sirné sloučeniny obsažené v AGE jsou stabilní látky bez zápachu s méně charakteristickou chutí, které jak se zdá, mají v organismu pozitivnější účinky ve srovnání se sloučeninami obsaženými v čerstvém česneku (*Corzo - Martinez et al., 2007*). AGE vykazuje větší antioxidační účinky než čerstvý česnek nebo česnekový prášek. Disponuje velkou schopností vylučovat volné radikály (*Imai et al., 1994*) a díky S-allyl cysteinu (SAC), který je hlavní složkou vyzrálého česnekového extraktu, zvyšuje hladinu enzymů s antioxidační aktivitou (*Geng et Lau, 1999*), prokazatelně zvyšuje produkci NO, který v buňkách působí jako antioxidant (*Das et al., 1995*) a chrání tedy buňky před oxidativním stresem a volnými radikály. Tuto domněnku potvrdila dále *Louis (2012)*,



kteřá prokázala, že extrakt připravený z česnekové slupky, který neobsahuje ani alliin ani allicin, ale pouze SAC, snižuje oxidativní stres a brání apoptóze. Bylo prokázáno, že AGE snižuje množství epikardiální tukové tkáňe (Ahmadi *et al.*, 2013). Podle Nakagawa *et al.* (1988) má AGE i hepatoprotektivní účinek. AGE dále zpomaluje stárnutí organismu a úbytek nervových buněk, zlepšuje kognitivní funkce, paměť (Sumi *et al.*, 2001) a zvýšeným přívodem krve k nervovým buňkám působí i proti rozvoji Alzheimerovy choroby (Chauhan, 2006). AGE snižuje riziko kardiovaskulárních onemocnění a to především inhibicí agregace krevních destiček (Allison *et al.*, 2014).

### **3.7. Vliv česneku na organismus**

Již staří Egypťané, Řekové či Římané si byli vědomi účinků česneku (Block, 1985) a byl tak důležitou součástí každodenního života nejen jako koření (Amagase, 2001), ale i pro své širokospektrální jak preventivní tak léčebné účinky (Poluninová 2001).

Po více než 5000 let používání česneku v medicíně lze konečně doložit, že česnek je zdrojem látek, které prospívají zdraví a patří mezi nejlevnější způsoby prevence kardiovaskulárních onemocnění (Balch, 1999). Podle některých studií prokazatelně snižuje hladinu cholesterolu (Warshafsky *et al.*, 1993, Silagy *et Neil*, 1994) a triacylglycerolů v krvi a snižuje krevní tlak (Bordia *et al.*, 1998, Iciek *et al.*, 2009). Jak prokázal Siegel *et al.* (1999), česnek nejen snižuje hladinu cholesterolu v krvi, ale pozitivně ovlivňuje i poměr LDL (snížení o 4%) a HDL (zvýšení o 8%) cholesterolu. Podle jiné studie ovšem nedošlo u pacientů, kteří po dobu 12 týdnů užívali česnekového oleje, k významnému snížení hladiny lipoproteinů v séru, celkového cholesterolu, LDL -cholesterolu, HDL - cholesterolu nebo triglyceridů (Berthold *et al.*, 1998). Česnek chrání LDL před oxidací (Lau, 2001) a brání ukládání lipidových částic na stěnách cév, čímž výrazně zabraňuje rozvoji aterosklerózy (Efendy *et al.*, 1997). K navázání LDL na stěny cév dochází především v přítomnosti vápenatých iontů (Siegel *et al.*, 2001, Siegel *et al.*, 2004).

Česnek se navíc ukazuje i jako neuroprotektivum, neboli látka chránící neurony před poškozením, zvyšující krevní průtok a pozitivně ovlivňující kognitivní funkce (Borelli *et al.*, 2007) tím, že aktivuje syntézu oxidu dusnatého, známého pro vazodilatační účinky (Das *et al.*, 1995). Neméně významnou úlohu hraje konzumace česneku ve zlepšení prokrvení končetin (Balch, 1999) a ve své práci se přímými vazodilatačními účinky zabývá i Öztrük *et al.* (1994). Česnek snižuje riziko diabetu mellitu (Banerjee *et al.*, 2003, Khayatnouri *et al.*, 2011) tím, že významně snižuje koncentraci lipidů v séru, hladinu glukózy v krvi a aktivitu

enzymů, jako je alkalická fosfatáza, kyselá fosfatáza a laktát dehydrogenáza a jaterní glukóza – 6 - fosfatáza (Sheela *et al.*, 1992). Česnek má antiseptické, antiparazitické (Adetumbi *et al.*, 1983, Hughes *et al.*, 1991, Koch, 1993, Kemper, 2000) a antikoagulační účinky (Ali, 1995, Iciek, 2009), které jsou zprostředkovány jeho schopností aktivovat antikoagulační systém. Česnek narušuje v trombocytech syntézu kyseliny arachidonové, která je prekurzorem tromboxanu (Ali *et al.*, 1999).

Česnek je silným inhibitorem růstu jak pro gram-pozitivní, tak gram-negativní bakterie jako např. *Streptococcus mutant* (Bakri *et al.*, 2005) *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Bacillus Proteus*, *Clostridium*, *Mycobacterium tuberculosis* (Uchida *et al.*, 1975) a *Helicobacter pylori* (Cellini, *et al.*, 1996, Ankri *et al.*, 1999). Alliin obsažený v česneku má dále antimykotické účinky. Yamada *et al.* (1977) ve své práci potvrdili inhibici klíčení spor a růstu hyf u těchto druhů: *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, a *Microsporum*. Mezi viry, které jsou citlivé na česnekový extrakt, patří např. virus chřipky B, herpes simplex virus typu 1, herpes simplex virus typu 2 nebo parainfluenza typu 3 (Tsai *et al.*, 1985).

Česnek povzbuzuje peristaltiku střev a tvorbu trávicích šťáv a je tedy doporučován i při zažívacích obtížích. Je běžně užíván při chronických infekcích horních cest dýchacích, astmatu a chřipce (Iciek *et al.*, 2009). Epidemiologické a preklinické studie dokazují, že česnek může mít vliv na onemocnění srdce a jak dokazuje studie amerických vědců, může mít vliv i na rakovinu (Dausch *et al.*, 1990, Koch *et al.*, 1996). Protinádorové vlastnosti česneku byly poprvé popsány Weisbergerem a Penským v roce 1958 (Islam *et al.*, 2011). Experimentálně bylo zjištěno, že česnek a jeho sirné sloučeniny mají vliv na potlačení výskytu nádorů žaludku (Guercio *et al.*, 2014), plic (Wattenberg *et al.*, 1989), ledvin (Takahashi *et al.*, 1992), tlustého střeva (Wargovich *et al.*, 1985), kůže (Rao *et al.*, 1990), konečníku, prsu a jak uvádí Hussain *et al.* (1990) česnek dokáže snížit výskyt rakoviny dělohy u myši až o 50%. Některé studie ovšem prokazují toxický účinek nejen proti nádorovým buňkám, ale i proti zdravým buňkám především gastrointestinálního traktu, pokud byly česnekové deriváty užity ve vyšších koncentracích (Banerjee *et al.*, 2003).

Dalším pozitivním účinkem je i to, že česnek působí hepatoprotektivně a působí jako protijed při otravě způsobené těžkými kovy (Banerjee *et al.*, 2003). Waseem *et al.* (2014) publikovali studii provedenou na myších ováriích, které byly vystaveny účinkům octanu olovnatého. Vaječníky, které byly ošetřeny česnekovým extraktem, vykazovaly pozitivní vliv, co se týče velikosti, tvaru, barvy a konzistence. Wang (1996) zjistil, že diallyl sulfid obsažený v česneku má ochranné účinky proti chemicky indukované hepatotoxicitě.

### **3.7.1. Oxidativní stres**

Česnek prokazatelně snižuje oxidativní stres (Banerjee *et al*, 2002), který je jednou z příčin obtíží *in vitro* kultivací oocytů a embryí (Ambruosi *et al.*, 2011). Obsahuje totiž bioflavonoidy, což jsou polyfenolové sloučeniny, které představují přirozený ochranný faktor proti plísním a mají velmi silnou antioxidační schopnost. Jako oxidativní stres je označován stav, kdy převažují volné kyslíkové radikály (ROS- reactive oxygen species) nad endogenními antioxidanty (Halliwell, 2007). Produkce ROS v organismu je zcela fyziologická. Přiměřené koncentrace ROS jsou naopak nepostradatelné v celé řadě fyziologických procesů (Kamata *et Hirata*, 1999). Zvýšená hladina ROS, a s ní spojený oxidativní stres, je považován za příčinu mnoha akutních a chronických onemocnění jako např. kardiovaskulární onemocnění, diabetes melitus 2. typu (Jones, 2006), nádorová onemocnění, záněty nebo neurodegenerativní onemocnění a jako děj doprovázející přirozené stárnutí organismu (Halliwell, 2007) Zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku v kultivačním médiu významně snižuje úspěšnost kultivace oocytů a embryí *in vitro* a takto vzniklá embrya mohou vykazovat vývojové abnormality. Zabránit produkci ROS v kultivačním médiu je nemožné, lze ovšem zmírnit důsledky přidáním antioxidantů do kultivačního Česnek nechrání samozřejmě před oxidativním stresem pouze samičí reprodukční soustavu ale i samčí jak ostatně dokazuje Ola - Mudathir *et al* (2008), česnek ochraňuje například buňky varletní tkáně před oxidativním stresem a Tunc *et al* (2009) publikoval vliv antioxidačních účinků česneku chránící DNA spermií před fragmentací a zvyšující metylaci DNA spermií. Příjem exogenních antioxidantů, jako jsou vitamín C, vitamín E, flavon, beta-karoten a další, může vyvážit nedostatečnou schopnost endogenních antioxidantů ochraňovat buňky před oxidativním stresem (Diplock *et Charleux*, 1998).

## **4 Materiál a metody**

### **4.1. Získávání a kultivace prasečích kumulo - oocytárních komplexů**



**Obrázek 5: Vaječníky pre-pubertálních prasnic (foto: autor práce, 2014)**

Kumulo-oocytární komplexy (COCs) byly získávány z vaječníků poražených dosud necyklujících prasnic. Odebrané vaječníky byly v termolahvích s fyziologickým roztokem (0,9 % NaCl) ihned přivázeny z jatek do laboratoře při dodržování konstantní teploty 39 °C a zpracovány nejpozději do 2 hodin po odběru. Po převozu byly jednotlivé vaječníky povrchově desinfikovány ethanolem a následně byla provedena aspirace folikulární tekutiny společně s oocyty pomocí injekční stříkačky (10 ml) s jehlou 20G. stříkačky. Pro aspiraci byly vybírány pouze folikuly o velikosti cca 2 až 5 mm. Aspirovaná folikulární tekutina byla z injekční stříkačky vytlačována do Petriho misky (Nunc, Roskilde, Denmark). Pod binokulární lupou byly z folikulární tekutiny za pomoci skleněné tenkostěnné kapiláry vybírány oocyty. Následně probíhala jejich selekce tak, aby byly vybrány pouze dorostlé oocyty o průměru 120  $\mu\text{m}$ , s neporušenou cytoplazmou a kompaktní vrstvou kumulárních buněk.

COCs byly před samotnou kultivací třikrát promývány v kultivačním médiu a poté kultivovány ve 4 - jamkové Petriho misce (Nunc, Denmark, viz obrázek č. 3) v 1 ml modifikovaného kultivačního média M199 (Sigma-Aldrich, USA). Toto médium obsahuje hydrogenuhličitan sodný (32,5 mM), laktát vápenatý (2,75 mM), gentamicin (0,025 mg/ml), HEPES (6,3 mM), gonadotropní hormony eCG a hCG v poměru 13,5 I.U. : 6,6 I.U./ml (P.G.600; Intervet, Holland) a 5 % (v/v) fetálního bovinního séra (GibcoBRL; Life Technologies, Germany). Experimentální skupina vzorků byla kultivována v přítomnosti S-allyl cysteinu 0,1 mM – 5 mM (Sigma- Aldrich). Kultivace probíhala v podmínkách řízené atmosféry 5 % CO<sub>2</sub>, při teplotě 39 °C po dobu 24 a 48 hodin.



Obrázek 6: Tenkostěnná kapilára, 4- jamková destička (foto: autor práce, 2014)



Obrázek 7: Kultivace oocytů v médiu (foto: autor práce, 2014)

## **4.2. Hodnocení stádia jaderného zrání**

Aby bylo možné zhodnotit stádium jaderného zrání, byly oocyty po dokončení kultivace zbaveny kumulárních buněk. K tomu došlo pomocí opakovaného nasávání a vypouštění úzkou tenkostěnnou kapilárou. Oocyty byly dále vloženy mezi podložní a krycí sklo a fixovány v octové kyselině a ethanolu (1:3, v/v) po dobu min. 48 hod. Hodnocení stádia meiotického zrání oocytů probíhalo pomocí světelného mikroskopu (Nikon, Japan) s fázovým kontrastem po obarvení 1% roztokem orceinu. Podle stádia jaderného zrání byly oocyty dále řazeny do následujících kategorií: GV – zárodečný váček (germinal vesicle), LD – pozdní diakineze (late diakinesis), MI – metafáze 1. meiotického dělení, MII – metafáze 2. meiotického dělení (Motlík *et* Fulka, 1976).

## **4.3. Měření produkce hyaluronové kyseliny**

Intenzita kumulární expanze byla měřena na základě produkce kyseliny hyaluronové (HA). Po 24 nebo 48 hodinách *in vitro* kultivace byly kumulo-oocytární komplexy 4 - krát opláchnuty ve 450  $\mu$ l PBS-PVA ve 4 - jamkových destičkách vždy 50 $\mu$ l PBS-PVA automatickou pipetou. Oocyty byly zbaveny kumulárních buněk opakovaným protahováním tenkostěnnou kapilárou a odstraněny ze vzorku. 500  $\mu$ l PBS-PVA s kumuly byly přeneseny do 1,5 ml mikro zkumavky Eppendorf a skladovány při -20 °C do dalšího použití. Po rozmrazení byl vzorek inkubován s lyázou ze *Streptomyces hyalurolyticus* (20  $\mu$ l/ml; Sigma-Aldrich, USA) při 39 °C po dobu 12 hodin. Po inkubaci byly vzorky skladovány při -20 °C do proměření. Po rozmrazení a centrifugaci probíhalo měření na spektrofotometru Helios Epsilon (Verkon, Czech Republic) při vlnové délce 216 nm. Pro odečet koncentrace byla sestavena kalibrační křivka. Jako slepý vzorek byl použit PBS-PVA s lyázou ze *Streptomyces hyalurolyticus*.

Koncentrace HA byla stanovena spektrofotometrickým měřením koncentrace štěpných produktů  $\beta$ -eliminace glykosidické vazby.

#### **4.4. Statistická analýza**

Každý experiment byl opakován min. 3x. Výsledky jsou interpretovány jako průměr  $\pm$  S. E. M. (standard error of the mean). Zaznamenané výsledky byly zpracovány pomocí statistické analýzy v programu SAS 9.1. Byl použit parametrický test ANOVA (t-test). Za statisticky významnou byla považována hodnota  $P < 0,05$ .

## 5 Výsledky

### 5.1 Vliv S-allyl cysteinu na průběh meiotického zrání po 24 h v *in vitro* podmínkách

Cílem experimentu bylo zhodnotit vliv S-allyl cysteinu na průběh meiotického zrání po 24 hod. *in vitro* kultivace. Experimenty nebyl prokázán vliv S-allyl cysteinu (koncentrace 0,1 mM; 0,5 mM a 1 mM) na průběh jaderného zrání. Nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi kontrolními vzorky (0 mM) a experimentálními vzorky na hladině významnosti ( $P < 0,05$ ). Z výsledků je patrné, že průběh meiotického zrání oocytů kultivovaných 24 hod. je standardní, kdy  $92,78 \pm 1,88$  % oocytů dosáhlo stádia MI (viz tabulka č. 1). Kompletní výsledky experimentů jsou uvedeny v příloze v tabulce č. 4.

Tabulka 1: Jaderné zrání oocytů po 24hod. *in vitro* kultivace v přítomnosti S-allyl cysteinu

	K	0,1mM SAC	0,5mM SAC	1mM SAC
GV	4,99±1,83 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	6,55±0,62 <sup>a</sup>	1,43±0,78 <sup>a</sup>
LD	2,1±0,77 <sup>a</sup>	0,8±0,72 <sup>a</sup>	1,43±0,79 <sup>a</sup>	3,05±0,69 <sup>a</sup>
MI	92,78±1,88 <sup>a</sup>	92,68±1,08 <sup>a</sup>	92,02±0,51 <sup>a</sup>	93,37±2,02 <sup>a</sup>
AITI	0,0±0,0 <sup>a</sup>	2,18±0,8 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>
MII	0,0±0,0 <sup>a</sup>	2,87±0,65 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>
Dg	0,74±0,66 <sup>a</sup>	1,47±0,81 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	2,14±1,28 <sup>a</sup>
N	134	137	137	133

K – kontrola; SAC – S-allyl cystein; GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku (germinal vesicle); LD – oocyty ve stádiu pozdní diakineze (last diakinesis); MI – oocyty ve stádiu metafáze I; AI/TI – oocyty ve stádiu anafáze I/telofáze I; MII – oocyty ve stádiu metafáze II; Dg – oocyty s degenerovaným chromatinem; <sup>a,b</sup> - Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní a experimentálními skupinami v jednotlivých stádiích meiotického zrání – v řádku ( $P < 0,05$ ).

### 5.2 Vliv S-allyl cysteinu na průběh meiotického zrání po 48 h v *in vitro* podmínkách

Cílem experimentu bylo zhodnotit vliv S-allyl cysteinu na průběh meiotického zrání po 48 hod. *in vitro* kultivace. Nebyl prokázán vliv S-allyl cysteinu (koncentrace 0,1 mM; 0,5 mM a 1 mM) na průběh jaderného zrání. Nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi kontrolními vzorky (0 mM) a experimentálními vzorky na hladině významnosti ( $P < 0,05$ ). Z výsledků vyplývá, že průběh meiotického zrání oocytů kultivovaných 48 hod.

je standardní, kdy  $92,3 \pm 1,35$  % oocytů dosáhlo stádia MII (viz tabulka č. 2). Kompletní výsledky experimentů jsou uvedeny v příloze v tabulce č. 5.

Tabulka 2: Jaderné zrání oocytů po 48hod. *in vitro* kultivace v přítomnosti S-allyl cysteinu

	K	0,1mM SAC	0,5mM SAC	1mM SAC
GV	1,49±0,82 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	2,82±1,55 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>
LD	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,8±0,72 <sup>a</sup>
MI	0,83±0,75 <sup>a</sup>	1,57±0,86 <sup>a</sup>	0,71±0,64 <sup>a</sup>	2,3±0,85 <sup>a</sup>
AITI	1,54±0,84 <sup>a</sup>	4,62±0,69 <sup>a</sup>	2,2±1,32 <sup>a</sup>	1,5±0,83 <sup>a</sup>
MII	92,3±1,35 <sup>a</sup>	92,24±1,26 <sup>a</sup>	93,61±1,68 <sup>a</sup>	93,13±1,22 <sup>a</sup>
Dg	3,85±1,61 <sup>a</sup>	1,57±0,86 <sup>a</sup>	0,67±0,6 <sup>a</sup>	2,27±0,84 <sup>a</sup>
N	134	137	137	133

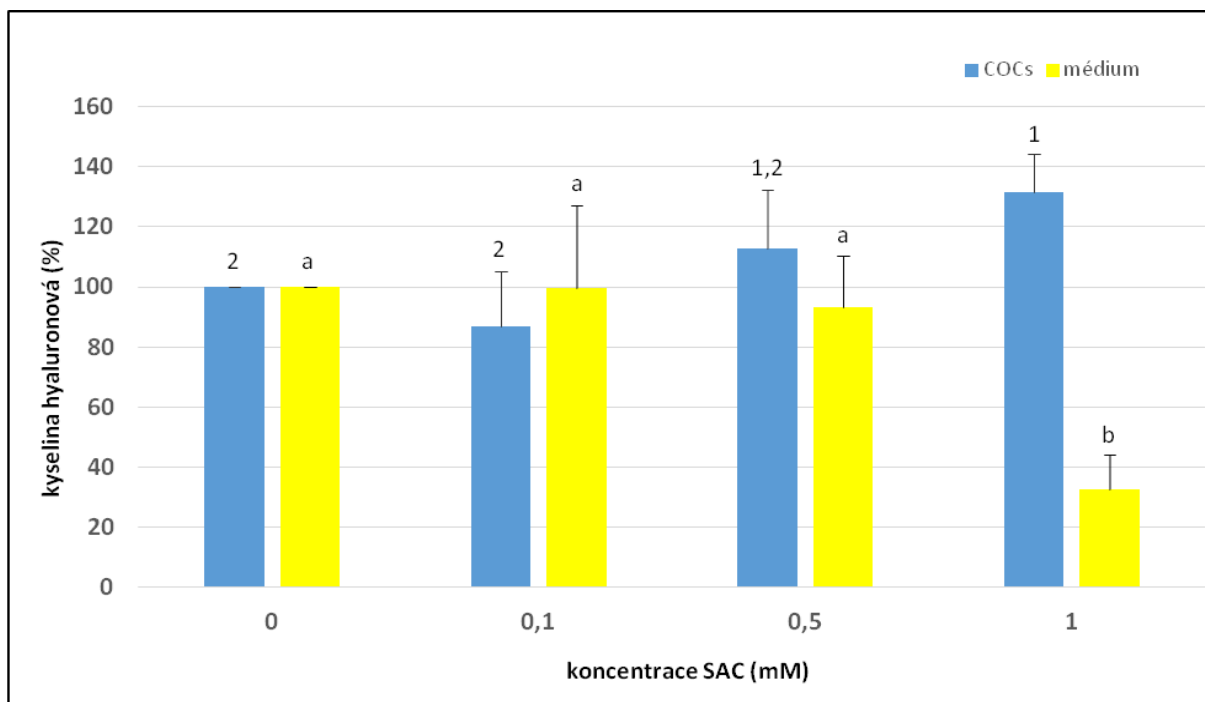
K – kontrola; SAC – S-allyl cystein; GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku (germinal vesicle); LD – oocyty ve stádiu pozdní diakineze (last diakinesis); MI – oocyty ve stádiu metafáze I; AI/TI – oocyty ve stádiu anafáze I/telofáze I; MII – oocyty ve stádiu metafáze II; Dg – oocyty s degenerovaným chromatinem; <sup>a,b</sup>- Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní a experimentálními skupinami v jednotlivých stádiích meiotického zrání – v řádku ( $P < 0.05$ ).

### **5.3 Vliv S-allyl cysteinu na kumulární expanzi po 24 hodinách v *in vitro* podmínkách**

Cílem experimentu bylo zhodnotit vliv S-allyl cysteinu na intenzitu kumulární expanze po 24 hod. *in vitro* kultivace kumulo-oocytárních komplexů (COCs). Jako ukazatel intenzity kumulární expanze bylo spektrofotometricky měřeno množství hyaluronové kyseliny zadržené v COCs. Současně bylo stanoveno množství HA uvolněné během kultivace COCs do kultivačního média.

S-allyl cystein ovlivnil produkci kyseliny hyaluronové. Při použití koncentrace 0,1 mM a 0,5 mM nebyl prokázán statisticky významný rozdíl proti kontrolním vzorkům. Při použití koncentrace 1mM však došlo ke zvýšení produkce zadržené kyseliny hyaluronové (COCs) a naopak k poklesu produkce uvolněné kyseliny hyaluronové (médium), viz obrázek č. 8.

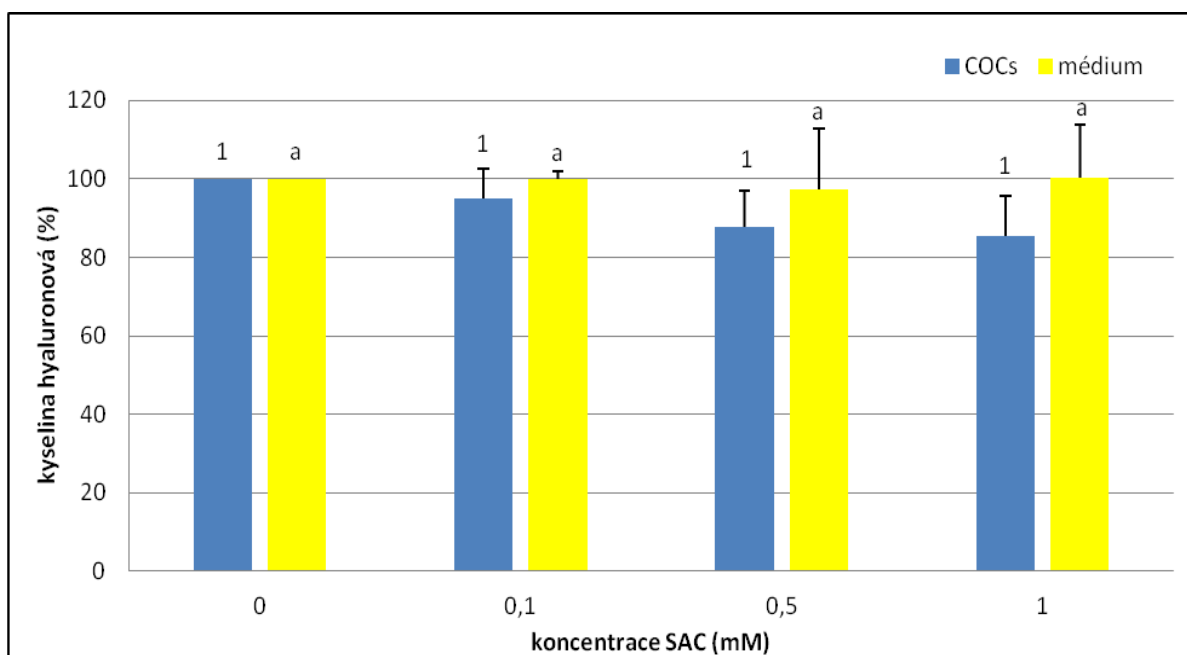




Obrázek 8: Produkce kyseliny hyaluronové po 24 hodinách *in vitro* kultivace v přítomnosti S-allyl cysteinu, COCs: hyaluronová kyselina zadržena v COCs; médium: hyaluronová kyselina uvolněná do kultivačního média. <sup>1,2;a,b</sup> - Statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a experimentálními skupinami ( $P < 0.05$ ).

#### **5.4 Vliv S-allyl cysteinu na kumulární expanzi po 48 hodinách v *in vitro* podmínkách**

Produkce kyseliny hyaluronové nebyla po 48 hodinách *in vitro* kultivace v přítomnosti S-allyl cysteinu ovlivněna viz obrázek č. 9. Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl ve vzorcích o koncentraci 0,1 mM; 0,5 mM a 1 mM SAC proti kontrolním vzorkům.



Obrázek 9: Produkce kyseliny hyaluronové po 48 hodinách *in vitro* kultivace v přítomnosti S-allyl cysteinu. COCs: hyaluronová kyselina zadržena v COCs; médium: hyaluronová kyselina uvolněná do kultivačního média. <sup>1,2;a,b</sup> - Statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a experimentálními skupinami ( $P < 0.05$ ).

Z dosavadních výsledků je zřejmé, že S-allyl cystein (SAC) ovlivňuje některé ukazatele meiotického zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách. Nebyl prokázán účinek SAC v procesu regulace jaderného zrání, ale bylo prokázáno, že S-allyl cystein prokazatelně ovlivňuje produkci kyseliny hyaluronové, která představuje důležitý marker meiotického zrání.

## **6 Diskuze**

Meiotické zrání je klíčovým procesem pro vznik oplození schopných oocytů. Jedním z důležitých ukazatelů průběhu meiotického zrání je dle dostupných informací kumulární expanze (Dekel *et al.*, 1979; Eppig, 1979). Kyselina hyaluronová plní v regulaci kumulární expanze (Yokoo *et al.*, 2003) a meiotického zrání (Yokoo *et al.*, 2010) důležitou úlohu. Dřívější experimenty potvrdili, že kumulární expanze je závislá na obsahu kyseliny hyaluronové v expandovaném kumulu (Dekel *et al.*, 1979) a tuto hodnotu lze využít jako ukazatel pro zhodnocení intenzity kumulární expanze a meiotického zrání oocytů (Němcová *et al.*, 2007, Nagyová, 2012). V procesu zrání oocytů hrají dále významnou roli signální molekuly, nejčastěji protein-kinázy, jako např.: MPF, MAPK nebo CSF (Stojkovic *et al.*, 1999, Su *et al.*, 2002, Liang *et al.*, 2007). Řada studií se zabývá i účinky gasotransmiterů jako signálních molekul na samčí i samičí reprodukční soustavu (Mustafa *et al.*, 2009, Amale *et al.*, 2011). Sirné sloučeniny obsažené v česneku mohou být přirozeným donorem jednoho z gasotransmiterů - sulfanu. Dle již publikovaných výzkumů se sulfan podílí na stimulaci meiotického zrání prasečích oocytů (Nevoral, 2014).

Řadou studií byly prokázány pozitivní účinky česneku na organismus, mezi které lze řadit např. vliv na srážení krve (Iciek, 2009), hladinu triacylglycerolů v krvi nebo vliv na snížení výskytu rakoviny (Hussain *et al.*, 1990, Guercio *et al.*, 2014). Ačkoli se autoři prací jednoznačně neshodují, které sloučeniny jsou zodpovědné za pozitivní účinky, dle dostupných poznatků se jedná nejspíše o sirné sloučeniny obsažené v česneku (Das *et al.*, 1995, Geng *et al.*, 1999, Fukao *et al.*, 2004, Pinto *et al.*, 2006). Sirné sloučeniny prokazatelně působí na snižování oxidativního stresu v buňkách (Banerjee *et al.*, 2002). Právě zvýšená hladina reaktivních forem kyslíku v kultivačním médiu, způsobuje oxidativní stres a významně tak snižuje úspěšnost kultivace oocytů a embryí *in vitro* (Tamura *et al.*, 2008). Bylo prokázáno, že sirná sloučenina S-allyl cystein, obsažená ve vyzrálém česnekovém extraktu, působí jako antioxidant hned několika způsoby. Podle Geng *et al.* (1999) zvyšuje hladinu enzymů s antioxidantní aktivitou. Das *et al.* (1995) publikovali, že sirné sloučeniny česneku jsou schopné ovlivnit signální dráhu dalšího z gasotransmiterů - NO, který se rovněž uplatňuje v regulaci meiotického zrání oocytů. Dalším antioxidantním mechanismem česneku je i schopnost vychytávat volné radikály (Imai *et al.*, 1994).

V experimentu byl zhodnocen vliv S-allyl cysteinu na průběh meiotického zrání po 24 a 48 hodinách *in vitro* kultivace. Pro experimenty byla použita sirná sloučenina

česneku, jejíž účinek se ukázal být nejsilnější (Corzo - Martinez *et al.*, 2007). Nebyl prokázán efekt na meiotické zrání a oocyty ošetřené SAC dozrály standardně ve srovnání s oocyty v kontrolní skupině. Je pravděpodobné, že SAC působí na úrovni cytoplazmatických faktorů, jako jsou kinázy regulující meiotické zrání. Rovněž lze předpokládat pokles hladiny ROS a snížení oxidačního stresu. Tyto změny mohou vést k vyšší vývojové kompetenci oocyty (Ambruosi *et al.*, 2011). Vedle toho lze předpokládat efekt SAC založený na uvolňování sulfanu, jehož protektivní účinek na prasečí oocyty byl popsán nedávno (Nevoral *et al.*, 2014, Krejčová *et al.*, 2015). Dále byl hodnocen vliv S-allyl cysteinu na kumulární expanzi kumulo - oocytárních komplexů (COCs) po 24 a 48 hodinách v *in vitro* podmínkách. Jako ukazatel intenzity kumulární expanze bylo v experimentu použito spektrofotometrické měření množství hyaluronové kyseliny. Pro komplexní zhodnocení kumulární expanze bylo nutné stanovení celkového obsahu hyaluronové kyseliny. V našem experimentu byly tedy podrobeny analýze jak vzorky zadržené kyseliny hyaluronové v COCs, tak uvolněné do kultivačního média, ve kterém probíhalo *in vitro* zrání. Z výsledků vyplývá, že S-allyl cystein ovlivnil produkci kyseliny hyaluronové po 24 hodinách kultivace *in vitro*. Při použití nižších dávek SAC (0,1; 0,5mM) sice nebyl prokázán statisticky významný rozdíl ale při použití koncentrace 1mM došlo ke zvýšení produkce zadržené kyseliny hyaluronové a naopak k poklesu produkce uvolněné kyseliny hyaluronové. Opačný efekt na množství hyaluronové kyseliny zadržené v COCs a uvolněné do kultivačního média může mít příčinu v modifikaci vazebných proteinů expandovaného kumulu (HABPs – hyaluronic acid binding proteins), na které jsou řetězce hyaluronové kyseliny navázané (Němcová *et al.*, 2007). Na základě tohoto pozorování se lze domnívat, že SAC je schopen strukturu těchto proteinů měnit ve prospěch zadržené hyaluronové kyseliny v COCs.

Jedním z dalších možných vysvětlení mechanismu účinku sirných sloučenin česneku je uvolňování gasotransmiteru sulfanu ( $H_2S$ ) (Kamoun, 2004, Stárka, 2010). V takovém případě se lze domnívat, že uvolněný sulfan působí prostřednictvím post-translační modifikace proteinů – S-sulhydratací (Mustafa *et al.*, 2009). Je známo, že  $H_2S$  může mít vliv na aktivitu iontových kanálů (Tang *et al.*, 2010). Již dříve byla popsána S-sulhydratace kinázy MEK (Zhao *et al.*, 2004), která se podílí na signalizaci MAPK. Lze se tak domnívat, že prostřednictvím  $H_2S$  je potenciálně možné regulovat meiotické zrání oocytů. Podle (Qian *et al.*, 2003) je kumulární expanze nezbytná pro meiotickou a vývojovou kompetenci oocytů. Mechanismus účinku  $H_2S$  na expanzi kumulárních buněk je doposud nejasný. Dle dosud publikovaných studií se předpokládá pozitivní efekt  $H_2S$  na vývojovou kompetenci během

zrání *in vitro* (Nevoral *et al.*, 2014). Pro ověření sirných sloučenin česneku jako přirozeného donoru H<sub>2</sub>S je zapotřebí dalších experimentů.

Vlastní pozorování nenasvědčuje, že by sirné sloučeniny česneku měly přímý efekt na průběh meiotického zrání. Je však pravděpodobné, že S-sulfhydratace se podílí také na modifikaci HABPs a tím na schopnosti vázat hyaluronovou kyselinu v COCs. S-sulfhydratace těchto proteinů však dosud popsána nebyla.

Jak publikuje Yokoo *et al.*(2002) na membráně oocytů se nachází receptor CD44. CD44 je membránový receptor pro HA patřící mezi HABPs, které se v prasečích oocytech uplatňují v průběhu meiotického zrání (Kimura *et al.*, 2002). Interakce mezi HA a CD44 během kumulární expanze jsou pro úspěšné zrání oocytů klíčové (Yokoo *et al.*, 2002; Yokoo *et al.*, 2007). Za předpokladu, že S-allyl cystein stimuluje kumulární buňky ke zvýšené produkci hyaluronové kyseliny, je možné, že právě tímto mechanismem ovlivňuje membránu oocytů a tím pozitivně reguluje meiotické zrání a následný embryonální vývoj, bez vizuálních změn morfologie chromatinu.

Z experimentů je patrné, že S-allyl cystein neovlivňuje morfologické ukazatele chromatinu zrajících oocytů. Jeho přínos lze očekávat ve zvyšování cytoplazmatické kvality, zejména pak faktorů, které se podílí na nabývání vývojové kompetence oocytů. Experimenty ověřující tuto domněnku jsou předmětem dalšího studia.

## **7 Závěr**

Lze konstatovat, že stanovená hypotéza byla ověřena a SAC ovlivňuje COCs kultivované *in vitro*. Byl prokázán efekt 1 mM SAC na kumulární expanzi vyjádřené produkcí hyaluronové kyseliny bez ovlivnění průběhu meiotického zrání vyjádřeného morfologickým hodnocením chromatinu oocytů.

Meiotické zrání oocytů je komplexně regulovaný proces, jehož poznání a schopnost regulace je pro zdokonalování reprodukčních biotechnologií v podmínkách *in vitro* nezbytné. Současně s meiotickým zráním probíhající kumulární expanze se podílí na regulaci meiotického zrání a rovněž slouží jako ukazatel zrání oocytů *in vitro*.

Výsledky experimentu dokazují, že sirá sloučenina S-allyl cystein neovlivňuje průběh meiotického zrání prasečích oocytů. Hodnocením produkce hyaluronové kyseliny bylo prokázáno, že S-allyl cystein má stimulační efekt na intenzitu kumulární expanze po 24 hod. kultivace *in vitro*. Na základě získaných výsledků je možné se domnívat, že S-allyl cystein má schopnost zasahovat do regulace kultivace COCs v podmínkách *in vitro*.

Bylo by přínosné věnovat se i nadále účinkům sirných sloučenin česneku, aby bylo možné lépe porozumět jejich úloze v procesu regulace meiotického zrání oocytů. Hodnocení vlivu S-allyl cysteinu na časný embryonální vývoj takto ošetřených oocytů, by mělo být předmětem dalších studií. Zároveň by se tyto poznatky daly aplikovat i v oblasti lidské asistované reprodukce.

## **8 Seznam literatury**

Adetumbi, M. A., Lau, B. H. 1983. *Allium sativum* – a natural antibiotic. Med Hypothesis. 12. 227 - 337.

Ahmadi, N., Nabavi, V., Hajsadeghi, F., Zeb, I., Flores, F., Ebrahimi, R., Budoff, M. 2013. Aged garlic extract with supplement is associated with increase in brown adipose, decrease in white adipose tissue and predict lack of progression in coronary atherosclerosis. International journal of kardiology. 168 (3). 2310 - 2314.

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

Ali, M. 1995. Mechanism by which garlic (*Allium sativum*) inhibits cyclooxygenase activity. Effect of raw versusboiled garlic extract on the synthesis of prostanoids. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 53. 397 - 400.

Ali, M., Bordia, T., Mustafa, T. 1999. Effect of raw versus boiled aqueous extract of garlic and onion on platelet aggregation. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 60. 43 - 47.

Allison, G., L., Lowe, G., M., Rahman, K. 2014. Aged Garlic Extract May Inhibit Aggregation in Human Platelets by Suppressing Calcium Mobilization. School of Biomolecular Sciences. Liverpool John Moores University. England. The journal of nutrition (4).

Amagase, H., Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga S., Itakura, Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. J. Nutr. 131. 955 - 962.

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

Amagase, H., Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga, S., Itakura, Y. 2014. Intake of Garlic and Its Bioactive Components. Wakunaga Pharmaceutical Compan. Hiroshima. Japan. 739 - 11.

- Ambruosi, B., Filioli Uranio, M., Sardanelli, A. M., Pocar, P., Martino, N. A., Paternoster, M. S., Amati, F., Dell'Aquila, M. E. 2011. *In vitro* acute exposure to DEHP affects oocyte meiotic maturation, energy and oxidative stress parameters in a large animal model. *PLoS One*. 6 (11).
- Anderson, R., Fassler, R., Georges-Labouesse, E., Hynes, R. O., Bader, B. L., Kreidberg, J. A., Schaible, K., Heasman, J., Wylie, C. 1999. Mouse primordial germ cells lacking beta 1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development*. 126. 1655 - 1664.
- André, L., Gouzi, F., Thireau, J., Meyer, G., Boissiere, J., Delage, M., Abdellaoui, A., Feillet – Coudray, C., Fouret, G., Cristol, J. P., Lacampagne, A., Obert, P., Reboul, C., Fauconnier, J., Hayot, M., Richard, S., Cazorla, O. 2011. Carbon monoxide exposure enhances arrhythmia after cardiac stress: involvement of oxidative stress. *Basic Research in Cardiology*. 106 (6). 1235 – 1246.
- Ankri, S., Mirelman, D. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*. 1. 125 – 129.
- Apitzcastro, R., Cabrera, S., Cruz, M. R., Ledezma, E., Jain, M. K. 1983. Effects of garlic extract and of 3 pure components isolated from it on human-platelet aggregation, arachidonate metabolism, release reaction and platelet ultrastructure. *Thrombosis Research*. 32. 155 - 169.
- Apitzcastro, R., Badimon, J. J., Badimon, L. 1992. Effect of ajoene, the major antiplatelet compound from garlic, on platelet thrombus formation. *Thromb Res*. 68. 145 - 155.
- Bakri, I. M., Douglas, C. W. 2005. Inhibitory effect of garlic extract on bacteria. *Arch Oral Biol* 50. 645 - 651.
- Balch, F. J. 1999. *Ten Natural Remedies That Can Save Your Life*. Doubleday. p. 256. ISBN: 0385493495.
- Banerjee, S. K., Maulik, M., Mancahanda, S. C., Dinda, A. K., Gupta, S. K., Maulik, S. K. 2002. Dose-dependent induction of endogenous antioxidants in rat heart by chronic administration of garlic. *Life Sciences*. 70. 1509-1518.



- Banerjee, S. K., Mukherjee, P. K., Maulik, S. K. 2003. Garlic as an antioxidant: The good, the bad and the ugly. *Phytotherapy Research*. 17. 97 - 106.
- Bendel-Stenzel, M. R., Gomperts, M., Anderson, R., Heasman, J., Wylie, C. 2000. The role of cadherins during primordial germ cell migration and early gonad formation in the mouse. *Mechanisms of Development*. 91. 143 - 152.
- Berthold, H. K., Sudhop, T., von Bergmann, K. 1998. Effect of a garlic oil preparation on serum lipoproteins and cholesterol metabolism: a randomized controlled trial. *Jama*. 279. 1900 - 2.
- Block, E. 1985. The chemistry of garlic and onion, *Sci. Am*. 252. 94 – 99.
- Block, E., Ahmad, S., Jain, M. K., Crecely, R. W., Apitzcastro, R., Cruz, M. R. 1984. (E, Z)-ajoene- a potent antithrombotic agent from garlic. *Journal of the American Chemical Society*. 106. 8295 - 8296
- Bordia, A., Verma, S. K., Srivastava, K. C. 1998. Effect of garlic (*Allium Sativum*) on blood lipids, blood sugar, fibrinogen and fibrinolytic activity in patients with coronary artery disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 58. 257 - 263.
- Borrelli, F., Capasso, R. and Izzo, A. A. 2007. Garlic (*Allium Sativum* L.): Adverse effects and drug interactions in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51. 1386 - 1397.
- Bornslaegr, J. L., Mattei, P. M., Schultz, R. M. 1986. Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse maturation. *Developmental Biology*. 114. 453 – 462.
- Buccione, R., Schroeder, A. C., Eppig, J. J. 1990. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction*. 43. 543 - 547.
- Bulková, V., 2011. *Rostlinné potraviny*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů. 162. ISBN: 978 – 807 – 0135 - 327.
- Cavallito, C., Bailey, J. H. 1944. Allicin, the antibacterial principle of *Allium Sativum*. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J. Am. Chem. Soc*. 66. 1944 - 1952.

- Calvert, J. W., Coetzee, W. A., Lefer, D. J. 2010. Novel insights into hydrogen sulfide-mediated cytoprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*. 12 (10). 1203 - 1217.
- Cellini, L., Di Campli, E., Masulli, M., Di Bartolomeo, S., Allocati, N. 1996. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium Sativum*). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13. 273 – 277.
- Colin-Gonzalez, A. L., Santana, R. A., Silva-Islas, C. A., Chanez-Cardenas, M. E., Santamaria, A., Maldonado, P. D. 2012. The Antioxidant Mechanisms Underlying the Aged Garlic Extract - and S – Allylcysteine - Induced Protection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Corzo - Martinez, M., Corzo, N., Villamiel, M. 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*. 18. 609 - 625.
- Crozet, N., Kanka, J., Motlik, J., Fulka, J. 1986. Nucleolar fine-structure and RNA-synthesis in bovine oocytes from antral follicles. *Gamete Research*. 14. 65 - 73.
- Das, I., Khan, N. S., Sooranna, S. R. 1995. Potent activation of nitric oxide synthase by garlic: a basis for its therapeutic applications. *Curr Med Res Opin*. 13. 257 - 263.
- Dausch, J. G., Nixon, D. W. 1990. Garlic: a review of its relationship to malignant disease. *Prev Med*. 19. 346 - 361.
- Dekel, N., Hillensjo, Y., Kraicer, P. F. 1979. Maturation effects of gonadotropins on the cumulus - oocyte complex of the rat. *Biology of Reproduction*. 20. 191 - 197.
- Dekel, N. 1988. Regulation of oocyte maturation. The role of cAMP. *Annals of the New York Academy of Science*. 541. 211 - 216.
- Desai, H. G., Kalro, R. H., Choksi, A. P. 1990. Effect of ginger and garlic on DNA. *Indian J Med Res*. 92. 139 - 41.
- Diplock, A. T., Charleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Viña-Ribes, J. 1998. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr*. 1. 77 - 112.

- Driancourt, M. A. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*. 35. 55 - 79.
- Druesne-Pecollo, N., Chaumontet, C., Pagniez, A., Vaugelade, P., Bruneau, A., Thomas, M., Cherbuy, C., Duee, P. H., Martel, P. 2007. In vivo treatment by diallyl disulfide increases histone acetylation in rat colonocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 354. 140 - 147.
- Efendy, J. L., Simmons, D. L., Campbell, G. R., Campbell, J. H. 1997. The effect of the aged garlic extract, 'Kyolic', on the development of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 132. 37 - 42.
- Ellmore, G. S., Feldberg, R. S. 1994. Alliin lyase localization in bundle sheaths of garlic clove (*Allium Sativum*). *Am. J. Bot.* 81. 89 - 94.
- Elrod, J. W., Calvert, J. W., Morrison, J., Doeller, J. E., Kraus, D. W., Tao, L., Jiao, X. Y., Scalia, R., Kiss, L., Szabo, C., Kimura, H., Chow, C. W., Leffer, D. J. 2007. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (39). 15560 - 15565.
- Elvin, J. A., Yan, C., Wang, P., Nishimori, K., Matzuk, M. M. 1999. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9 - deficient ovary. *Molecular Endocrinology*. 13. 1018 - 1034.
- Eppig, J. J. 1980. Role of FSH stimulated cumulus expansion by mouse oocyte-cumulus cell complexes *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 22. 629 - 633
- Eppig, J. J. 1991. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte - granulosa cell complexes developed *in vitro* from preantral follicles *Biology of Reproduction*. 45. 824 - 830
- Eppig, J. J., Peters, A. H., Telfer, E. E., Wigglesworth, K. 1993. Production of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes grown *in vitro*: preliminary characterization of the factor. *Molecular Reproduction and Development*. 34 (4). 450 - 456.

- Fan, H., Tong, CH., Chen, D., Sun, Q. 2002. Roles of MAP kinase signaling pathway in oocyte meiosis. *Chinese Science Bulletin*. 47. 14. 1157 - 1162.
- Farina, M., Ribeiro, M. L., Franchi, A. 2001. Nitric oxide synthases in pregnant rat uterus. *Reproduction*. 121. 403-407.
- Fay, M. F., Chase, M. W. 1996. Resurrection of Themidaceae for the Brodiaea alliance, and recircumscription of Alliaceae, Amaryllidaceae and Agapanthoideae. 45. 441 - 451.
- Fenwick, G. R., Hanley, A. B. 1985. The genus *Allium*. Part 2. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 22. 273 – 377.
- Ferrell, J. J., Wu, M., Gerhart, J. C., Martin, G. S. 1991. Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule – associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Molecular and Cellular Biology*. 11 (4). 1965 – 1971.
- Filomeni, G., Aquilano, K., Rotilio, G. and Ciriolo, M. R. 2003. Reactive oxygen species-dependent c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide. *Cancer Research*. 63. 5940 - 5949.
- Fortune, J. E. Eppig, J. J. 1979. Effects of gonadotropins on steroid secretion by infanule and juvenile mouse ovaries *in vitro* *Endocrinology*. 105. 760 - 768.
- Fujimoto, T., Miyayama, Y., Fuyuta, M. 1977. Origin, migration and fine morphology of human primordial germ-cells. *Anatomical Record*. 188. 315 - 329.
- Fujimoto, T., Yoshinaga, K., Kono, I. 1985. Distribution of fibronectin on the migratory pathway of primordial germ-cells in mice. *Anatomical Record*. 211. 271 - 278.
- Fukao, T., Hosono, T., Misawa, S., Seki, T. and Ariga, T. 2004. The effects of allyl sulfides on the induction of phase II detoxification enzymes and liver injury by carbon tetrachloride. *Food and Chemical Toxicology*. 42. 743 - 749.
- Freeman, F., Kodera, Y. 1995. Garlic chemismy – stability of S - (2 - propenyl) 2-propene - 1 - sulfinothioate (Alicin) in blood. Solvents and simulated physiological fluids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43. 2332 - 2338.

- GarciaCastro, M. I., Anderson, R., Heasman, J., Wylie, C. 1997. Interactions between germ cells and extracellular matrix glycoproteins during migration and gonad assembly in the mouse embryo. *Journal of Cell Biology*. 138. 471 - 480.
- Geng, Z., Lau, B. H. S. 1999. Aged garlic extract modulates glutathione redox cycle and superoxide dismutase activity in vascular endothelial cells. *Phytotherapy Research*. 11 (1). 54 - 56.
- Gordo, A. C., He, C. L., Smith, S., Fissore, R. A. 2001. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 59 (1). 106 – 114.
- Guercio, V., Galeone, C., Turati, F., La Vecchia, C. 2014. Gastric Cancer and Allium Vegetable Intake: A Critical Review of the Experimental and Epidemiologic Evidence. *Nutrition and cancer-aninternational journal*. 66 (5). 757 - 773.
- Guthrie, D. H., Garrett, W. M. 2000. Changes in porcine oocyte germinal vesicle development as follicles approach preovulatory maturity. *Theriogenology*. 54. 389 - 399.
- Halliwell, B. 2007. *Biochemistry of oxidative stress*. Department of Biochemistry. Yong Loo Lin School of Medicine. National University of Singapore. Singapore. The Authors Journal compilation.
- Hess, K. A., Chen, L., Larsen, W. J. 1999. Inter-alpha-inhibitor binding to hyaluronan in the cumulus extracellular matrix is required for optimal ovulation and development of mouse oocytes. *Biology of reproduction*. 61. 2. 436 - 43.
- Hostetler, C. E., Kincaid, R. L., Miranda, M. A. 2003. The role of essential trace elements in embryonic and fetal development in livestock. *Veterinary Journal*. 166. 125 - 139.
- Hu, Y., Chen, X., Pan, T. T., Neo, K. L., Lee, S. W., Khin, E. S. W., Moore, P. K., Bian, J. S. 2008. Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*. 455 (4). 607 - 616.

- Hubbard, C. J., Price J. 1988. The Effects of Follicle-Stimulating Hormone and Cyclic Guanosine 3', 5' - Monophosphate on Cyclic Adenosine 3', 5' - Monophosphate Phosphodiesterase and Resumption of Meiosis in hamster cumulus - oocyte complexes. *Biology of Reproduction*. 39. 829 – 838.
- Hughes, B. G., Lawson, L. 1991. Antimicrobial effects of *Allium Sativum* L. (garlic), *Allium ampeloprasum* L. (elephant garlic) and *Allium cepa* L. (onion) garlic compounds and commercial garlic supplement products. *Phytother Res*. 5. 154 - 158.
- Hulshof, S. C. J, Bevers, M. M., van der Donk, H. A., van den Hurk, R. 1992. The isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction*. The Hague. 336 – 338.
- Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5 (2). 122 - 30.
- Hurk, R., Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, defferentiation and maturation ovarian follicles. *Theriogenology*. 63 (6). 1717 - 1751.
- Hussain, S. P., Jannu, L. N., Rao, A. R. 1990. Chemopreventive action of garlic on methylcholanthrene-induced carcinogenesis in the uterine cervix of mice. *Cancer Lett*. Feb.49 (2). 175 – 180.
- Cha, K. Y., Chian, R. C. 1998. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. *Human Reproduction*. 4. 103 - 20.
- Chauhan, N. B. 2006. Effect of agend garlic extract on APP processing and tau phosphorylation in Alzheimers transgenic model Tg2576. *Journal of Ethnopharmacology*. 108. 385 - 394.
- Chen, L., Wert, S. E., Hendrix, E. M., Russell, P. T., Cannon, M., Larsen, W. J. 1990. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of cumulus mass. *Molecular Reproduction Development*. 26. 236 – 247.

- Chen, L., Russell, P. T., Larsen, W. J. 1993. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Molecular Reproduction and Development*. 34. 87 - 93.
- Chen, J., Chi, M. M., Moley, K. H., Downs, S. M. 2009. cAMP pulsing of denuded mouse oocytes increases meiotic resumption via activation of AMP - activated protein kinase. *Reproduction*. 138 (5). 759 - 770.
- Chiquoine, A.D. 1954. The identification, origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anatomical Record*. 118. 135 - 146.
- Chmelíková, E., Jeřeta, M., Sedmíková, M., Petr, J., Tůmová, L., Kott, T., Lipovová, P., Jílek, F. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote*. 18 (3). 235 – 244. ISSN: 09671994.
- Cho, W. K., Stern, S., Biggers, J. D. 1974. Inhibition effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. *Journal of Experimental Zoology*. 187. 383 – 386.
- Iciek, M., Kwiecien, I. and Wlodek, L. 2009. Biological Properties of Garlic and Garlic-Derived Organosulfur Compounds. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 50. 247 - 265.
- 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 Med*. 60. 417 - 420.
- Islam, M. S., Kusumoto, Y., Al- Mamun, M. A. 2011. Cytotoxicity and Cancer (HeLa) Cell Killing Efficacy of Aqueous Garlic (*Allium Sativum*) Extract. *J. Sci. Res*. 3 (2). 375 - 382.
- Ito, J., Kashiwazaki, N. 2012. Molecular mechanism of fertilization in the pig. *Animal Science Journal*. 83. 10. 669 – 682.
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., Tilly, J. L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428. 145 – 150.
- Jones, D. J. 2006. Antioxidants & Redox Signaling. Department of Medicine. Division of Pulmonary, Allergy, and Critical Care Medicine. Emory University. 8. 1865 - 1879.

- Josling, P. 2003. Allicin The heart of garlic. Great Britain. S. 172. ISBN 1-904015-21-2.
- Kamata, H., Hirata, H. 1999. Redox regulation of cellular signalling. Cell Signal. 11. 1 - 14.
- Kamoun, P. 2004. H<sub>2</sub>S a new neuromodulator. Medicine Sciences. 20. 6 - 7. 697 - 700.
- Kelso, S. R., Nelson, T. E., Leonard, J. P. 1992. Protein kinase C – mediated enhancement of NMDA currents by metabotropic glutamate receptors in *Xenopus* oocytes. Journal of Physiology. 449. 705 - 718.
- Kemper, K. J. 2000. Garlic (*Allium Sativum*). The Center for Holistic Pediatric Education and Research. 49.
- Kidder, G., M., Mhawi, A., A. 2002. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. Reproduction. 123. 613 - 620.
- Kimura, H. 2000. Hydrogen Sulfide Induces Cyclic AMP and Modulates the NMDA Receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications. 267. p. 129-133.
- Kishimoto, T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. Current Opinion in Cell Biology. 15 (6). 654 - 663.
- Kodera, Y., Suzuki, A., Imada, I., Kasuga, S., Sumioka, I., Kanezawa, A., Fujikawa, M., Nagae, S., Masamoto, K., Maeshige, K., Ono, K. 2002. Physical, chemical, and biological properties of S - allylcysteine, an amino acid derived from garlic. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 50. 622 – 32.
- Koch, H. P. 1993. Garlicin – fact or fiction?. Phytother Res. 7. 278 - 280.
- Koch, H. P., Lawson, L. D. 1996. Garlic: the science and therapeutic application of *Allium Sativum* L. and related species. Baltimore, MD: Williams & Wilkins. 213 – 220.
- Khayatnouri, M., Bahari, K., Safarmashaei, S. 2011. Study of the effect of gliclazide and garlic extract on blood sugar level in STZ – induced Diabetic Male Mice. Advances in Environmental Biology. 5 (7). 1751-1755.



- Khedim, T., Amirouche, N., Amirouche, R. 2013. Biosystematics and Plant Genetic Resources: Example from the Genus *Allium* (Amaryllidaceae) of the Algerian Flora. *Int Soc Horticultural science*. 997. 19-23. ISBN: 978-90-66055-56-8
- Konvička, O. 1998. Česnek (*Allium Sativum* L.): základy biologie a pěstování, obsahové látky a léčivé účinky. Olomouc. s. 167. ISBN: 80-238-1928-3.
- Krejčová, T., Šmelcová, M., Petr, J., Bodart, J. F., Sedmíková, M., Nevoral, J., Dvořáková, M., Vyskočilová, A., Weingartová, I., Kučerová-Chrpová, V., Chmelíková, E., Tůmová, L., Jílek, F. 2015. Hydrogen sulfide donor protects porcine aocytes against aging and improves the developmental potential of aged porcine oocytes. *Czech Univ Life Science. Prague. PLOS ONE*. 10 (1).
- Kvasnička, F., Ševčík, R. 2009. Výživa a potraviny. Antioxidanty potravin. (5). s. 32.
- Lachmann, G., Lorenz, D., Radeck, W., Steiper, M. 1994. Studies on the pharmacokinetics of the S35 labeled Garlic constituents allin, Alicin and vinylthiines. *Arzneimittel- Forschung/ Dtug Research*. 44 (1). 734 - 743.
- Lamon, B. D., Zhang, F. F., Puri, N., Brodsky, S. V., Goligorsky, M. S., Nasjletti, A. 2009. Dual pathways of carbon monoxide – mediated vasoregulation: modulation by redox mechanism. *Circulation Research*. 105 (8). 775 – 783.
- Lanzotti, V. 2006. The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*. 1112. 3 - 22.
- Lau, B. H. S. 2001. Suppression of LDL oxidation by garlic. *Journal of Nutrition*. 131. 985 - 988.
- Lawson, L. D., Hughes, B. G. 1992. Characterization of the formativ of Alicin and other thiosulfinates from garlic. *Planta Medica*. 58. 346 - 350.
- Lawson, L. D., Wang, Z. L. 1993. Prehepatic fate of the organosulfur compounds derived from (*Allium Sativum*). *Planta Med*. 59. 688 - 689.
- Lawson, L. D, Wang, Z. J. 2005. Alicin and alicin-derived garlic compounds increase breath acetone through allyl methyl sulfide: Use in measuring alicin bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53. 1974 - 1983.

- Levytska, K., Kingdom, J., Baczyk, D., Drewlo, S. 2013. Heme oxygenase – 1 in placental development and pathology. *Placenta*. 34 (4). 291 – 298.
- Li, M., Min, J. M., Cui, J. R., Zhang, L. H., Wang, K., Valette, A., Davrinche, C., Wright, M., Leung-Tack, J. 2002. Z - Ajoene induces apoptosis of HL - 60 cells. Involvement of BCL - 2 cleavage. *Nutrition and Cancer-an International Journal*. 42. 241 - 247.
- Li, L., Rose, P., Moore, P. K. 2011. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Pharmacol Toxicol*. 51 (10). 169 - 187.
- Li, L., Han, Z. Y., Li, C. M., Jiang, X. Q., Wang, G. L. 2013. Upregulation of heat shock protein 32 in Sertoli cells alleviates the impairments caused by heat shock – induced apoptosis in mouse testis. *Cell Stress and Chaperones*. 18 (3). 333 – 351.
- Liang, R., Yu, W. D., Du, J. B., Yang, L. J., Yang, J. J., Xu, J., Shang, M., Guo, J. Z. 2007. Cystathionine beta synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reproductive Toxicology*. 24 (1). 89 – 96.
- Lim, J. J., Liu, Y. H., Khin, E. S. W., Bian, J. S. 2008. Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-cell Physiology*. 295 (5). 1261 - 1270.
- Louis, X. L., Murphy, R., Thandapilly, S. J., Yu, L., Netticadan, T. 2012. Garlic extracts prevent oxidative stress, hypertrophy and apoptosis in cardiomyocytes: a role for nitric oxide and hydrogen sulfide. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12. 140
- Lybarger, J. A., Gallagher, J. S., Pulver, D. W., Litwin, A., Brooks, S., Bernstein, I. L. 1982. Occupational asthma induced by inhalation and ingestion of garlic. *J. Allergy Clin. Immunol*. 69. 448 – 454.
- Makabe, S., Nottola, S. A, Motta, P. M. 1989. Life history of the human female germ cell: Ultrastructural aspects. *Ultrastructure of human 46 gametogenesis and early embryogenesis*. London. Kluwer Academic. 33 – 60.

Makabe, S., Naguro, T., Nottola, S., Pereda, J., Motta, P. 1991. Migration of germ cells, development of the ovary, and folliculogenesis. Ultrastructure of the ovary. Rome. Antonio Delfino Editore. 1 - 27.

Makabe, S., Naguro, T., Motta, P. M. 1992. A new approach to the study of ovarian follicles by scanning electron microscopy and osmotic maceration. Archives of Histology and Cytology. 55. 183-190.

Malý, I., Petříková, K. 2000. Základy pěstování cibulové zeleniny. Praha. Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR. Rostlinná výroba. s. 26. ISBN: 80-710-5205-1.

Mancardi, D., Penna, C., Merlino, A., Del Soldato, P., Wink, D. A., Pangliaro, P. 2009. Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: Hydrogen sulfide. Biochimica et biophysica Acta-Bioenergetics. 1787 (7). 864 - 872.

McCann, S. M. 1982. Physiology and pharmacology of LHRH and somatostatin. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 22. 491-515.

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

Mlynářčiková, A., Nagyová, E., Ficková, M., Scsuková, S. 2009. Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes. Toxicol *In vitro*. 23. 371 – 377.

Motlík, J., Fulka, J., Fléchon, J. - E. 1986. Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation in vivo and *in vitro*. Journal of Reproductions and Fertility. 76. 31 - 37.

Motlík, J., Procházka, R., Nagyová, E., Schellander, K., Brem, G. 1998. Paracrine and autocrine regulation of cumulus expansion in porcine follicles. Reproduction in Domestic Animals. 33. 181 - 185.

- Mustafa, A. K., Gadalla, M. M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S. K., Barrow, R. K., Yang, G., Wang R, Snyder, S. H. 2009. H<sub>2</sub>S signals through protein S-sulfhydration. *Science Signaling*. 2. 72.
- Nagyová, E. 2012. Regulation of cumulus expansion and hyaluronan synthesis in porcine oocyte-cumulus complexes during *in vitro* maturation. *Endocrine regulations*. 46. 225 – 235.
- Nakagawa, Y., Tayama, K. 1988. Effect of buthionine sulfoximine on orthophenylphenol-induced hepato- and nephrotoxic potential in male rats. *Archives of Toxicology*. 62 (6). 452 - 457.
- Nakagawa, S. Masamoto, K. Sumiyoshi, H. Kunihiro, K., Fuwa, T. 1980. Effect of raw garlic juice and aged garlic extract on growth of young rats and their organs after peroral administration. *J. Toxicol. Sci*. 5. 91 – 112.
- Nakagawa, H., Tsuta, K., Kiuchi, K., Senzaki, H., Tanaka, K., Hioki, K. and Tsubura, A. 2001. Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis*. 22. 891 - 897.
- Nakamura, Y., Yamagata, Y., Sugino, N., Takayama, H., Kato, H. 2002. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biology of Reproduction*. 67 (5). 1588-1592.
- Nakayama, T., Inoue, M., Sato, E. 1996. Effect of oocyectomy on glycosaminoglycan composition during cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes cultured *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 55 (6). 1299 - 1304.
- Němcová, L., Nagyová, E., Petlach, M., Tománek, M., Procházka, R. 2007. Molecular mechanisms of insulin-like growth factor 1 promoted synthesis and retention of hyaluronic acid in porcine oocyte-cumulus complexes. *Biology of reproduction*. 76 (6). 1016 - 1024.
- Nevoral, J., Petr, J., Gelaude, A., Bodart, J. F., Kucerova-Chrpova, V., Sedmikova, M., Krejcova, T., Kolbabova, T., Dvorakova, M., Vyskocilova, A., Weingartova, I., Krivohlavkova, L., Zalmanova, T., Jilek, F. 2014. Dual Effects of Hydrogen Sulfide Donor on Meiosis and Cumulus Expansion of Porcine Cumulus-Oocyte Complexes. *PLoS ONE* 9. 7.

Němcová, L., Nagyová, E., Petlach, M., Tománek, M., Procházka, R. 2007. Molecular Mechanisms of Insulin-Like Growth Factor 1 Promoted Synthesis and Retention of Hyaluronic Acid in Porcine Oocyte-Cumulus Complexes. Academy of Sciences of the Czech Republic, Biology of reproduction. 76. 1016 – 1024.

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

O’Gara, E. A., Hill, D. J., Maslin, D. J. 2000. Activities of Garlic Oil, Garlic Powder, and Their Diallyl Constituents against *Helicobacter pylori*. University of Wolverhampton, United Kingdom. 66 (5). 2269 - 2273.

Ola - Mudathir, K. F., Suru, S. M. Fafunso, M. A., Obioha, U. E., Faremi, T. Y. 2008. Protective roles of onion and garlic extracts on kadmium-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. Food and Chemical Toxicology. 46. 3604 - 3611.

Ovesná, J., Stavěliková, H., Svobodová, L., Horníčková, J., Velíšek, J. 2003. Akumulace cysteinsulfoxidů a selenu v česneku. Praha- Výzkumný ústav rostlinné výroby. 61. 30 - 35. ISSN: 0139-6013.

Öztrük, Y., Aydin, S., Kosar, M., Baser, K. H. 1994. Endothelium-dependent and independent effects of garlic on rat aorta. Ethnopharmacol. 44. 109 - 116.

Pae, H. O., Lee, Y. C., Jo, E. K., Chung, H. T. 2009. Subtle Interplay of Endogenous Bioactive Gases (NO, CO and H<sub>2</sub>S) in Inflammation. Archive of Pharmacal Research. 32 (8). 1155 - 1162.

Pan, T. T., Neo, K. L., Hu, L. - F. Yong, Q. C., Bain, J. S. 2008. H<sub>2</sub>S preconditioning-induced PKC activation regulates intracellular calcium handling in rat cardiomyocytes. American Journal of Physiology – Cell Physiology. 294 (1). 169 - 177.

Park, E. K., Kwon, K. B., Park, K. I., Park, B. H. Jhee, E. C. 2002. Role of Ca<sup>2+</sup> in diallyl disulfide - induced apoptotic cell death of HCT-15 cells. Experimental and Molecular Medicine. 34. 250 - 257.

- Pavlok, A., Lucashahn, A., Niemann, H. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*. 31. 63 - 67.
- Petr, J., Rozinek, J., Hruban, V., Jílek, F., Sedmíková, M., Vaňourková, Z., Němeček, Z. 2001. Ultrastructural localization of calcium deposits during *in vitro* culture of pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 58. 196 – 204.
- Peyton, K. J., Reyna, S. V., Chapman, G. B., Ensenat, D., Liu, X. M., Wang, H., Schafer, A. I., Durante, W. 2002. Heme oxygenase – 1 derived carbon monoxide is an autocrine inhibitor of vascular smooth muscle cell growth. *Blood*. 99 (12). 4443 – 4448.
- Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145. 27 – 37.
- Pinto, J. T., Krasnikov, B. F. and Coopert, A. J. L. 2006. Redox-sensitive proteins are potential targets of garlic-derived mercaptocysteine derivatives. *Journal of Nutrition*. 136. 835 - 841.
- Poluninová, M. 2001. *Léčiva z přírody*. Praha. Gemini. s. 10 – 28.
- Procházka, R., Nagyová, E., Brem, G., Schellander, K. 1998. Secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEF) in porcine follicles. *Molecular Reproduction and Development*. 49. 141 - 149.
- Qian, Y., Shi, W. Q., Ding, J. T., Sha, J. H., Fan, B. Q. 2003. Predictive value of the area of expanded cumulus mass on development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development*. 49 (2). 167 - 74.
- Rabinkov, A., Miron, T., Mirelman, D., Wilchek, M., Glozman, S., Yavin, E., Weiner, L. 2000. S - Allylmercaptogluthatione: the reaction product of Alicin with glutathione possesses SH - modifying and antioxidant properties. *Biochemica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. 1499. 144 - 153.
- Rao, A. R., Sadhana, A. S., Goel, H. C. 1990. Inhibition of skin tumors in DMBA - induced complete carcinogenesis system in mice by garlic (*Allium Sativum*). *Indian J Exp Biol*. 28 (5). 405 – 408.

- Ratner, A. 1976. Effects of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone upon cyclic AMP and cyclic GMP levels in rat ovaries *in vitro*. *Endocrinology*. 99. 1496 – 1500.
- Reiffenstein, R. J., Hulbert, W. C., Roth, S. H. 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32. 109 – 134.
- Rendu, F., Daveloose, D., Debouzy, J. C. 1989. Ajoene, the antiplatelet compound derived from garlic, specifically inhibits platelet release reaction by affecting the plasma membrane internal microviscosity. *Biochem Pharmacol* 38. 1321 - 8.
- Rosselli, M., Keller, P. J., Dubey, R. K. 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update*. 4 (1). 3-24.
- Sadler, T. W. 2011. *Langmanova lékařská embryologie*. Grada Publishing. Praha. 432. ISBN: 978 – 80 – 247 – 2640 – 3.
- Sheela, C. G., Augusti, K. T. 1992. Antidiabetic effects of S-allyl cysteine sulphoxide isolated from garlic *Allium Sativum* L. *Indian J. Exp. Biol.* 30. 523 – 526.
- Siegel, G., Walter, A., Engel, S., Walper, A., Michel, F. 1999. Pleiotropic effects of garlic. *Wien Med Wochenschr.* 149. 217 - 224.
- Siegel, G., Malmsten, M., Klussendorf, D. and Michel, F. 2001. A receptor-based biosensor for lipoprotein docking at the endothelial surface and vascular matrix. *Biosensors & Bioelectronics*. 16. 895 - 904.
- Siegel, G., Malmsten, M., Pietzsch, J., Schmidt, A., Buddecke, E., Michel, F., Ploch, M. and Schneider, W. 2004. The effect of garlic on arteriosclerotic nanoplaque formation and size. *Phytomedicine*. 11. 24 - 35.
- Silagy, C., Neil, A. 1994. Garlic as a lipid lowering agent - a meta-analysis. *J. R. Coll Physicians Lond.* 28. 39 - 45.
- Schmidt, A., Rauh, N. R., Nigg, E. A., Mayer, T. U. 2006. Cytostatic factor: An activity that puts the cell cycle on hold. *Journal of Cell Science*. 119. 1213 - 1218.

- Stárka, L. 2010. Hydrogen Sulfide - Another Gaseous Hormone?. *Chemické listy*. 103 (1). 28 - 31.
- 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 of Domestic Animal*. 34. 335 – 342.
- Sumi, S., Tsuneyoshi, T., Matsuo, H., Yoshimatsu, T. 2001. Isolation and characterization of the genes up-regulated in isolated neurons by aged garlic extract (AGE). *Journal of Nutrition*. 131. 1096 - 1099.
- Sun, Q., Nagai, T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journals of Reproduction and Development*. 49 (5). 347 - 59.
- Sun, X., Liu, Y., Yue, K., Ma, S., Tan, J. 2004. Changes in germinal vesicle (GV) chromatin configurations during growth and maturation of porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 69 (2). 228 - 234.
- Šutovský, P., Fléchon, J. E., Pavlok, A. 1994. Microfilaments, microtubules and intermediate filaments fulfil differential roles during gonadotropin-induced expansion of bovine cumulus oophorus. *Reproduction Nutrition Development*. 34. 415 - 425.
- Takahashi, S., Hakoi, K., Yada, H., Hirose, M., Ito, N., Fukushima, S. 1992. Enhancing effects of diallyl sulfide on hepatocarcinogenesis and inhibitory actions of the related diallyl disulfide on colon and renal carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*. 13. 1513 - 1518.
- Takhtajan, A. 1997. *Diversity and Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press. New York. 643.
- Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Taketani, T., Matsuoka, A., Yamagata, Y., Shimamura, K., Morioka, H., Ishikawa, H., Reiter, R. J., Sugino, N. 2007. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*. 44. 280 – 287.



- Tang, G. H., Wu, L. Y., Wang, R. 2010. Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 37 (7). 753 - 763.
- Tatarintsev, A. V., Vrzhets, P. V., Ershov, D. E., Turgiev, A. S., Karamov, E. V., Kornilaeva, G. V., Makarova, T. V., Fedorov, N. A., Varfolomeev, S. D. 1992. The ajoene blockade of integrin-dependent processes in an HIV-infected cell system. *Vestn. Rossi. Akad. Med. Nauk*. 11. 6 - 10.
- Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R. 1969. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 244. 6388-6394.
- Tichovská, H., Petr, J., Chmelíková, E., Sedmíková, M., Tůmová, L., Šmelcová, M., Dórflerová, A., Rajmon, R. 2011. Nitric oxide and meiotic competence of porcine oocytes. *Animal*. 5. 9. 1398 - 1405. ISSN: 1751 – 7311.
- Tunc, O., Tremellen, K. 2009. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *Assist Reprod Genet*. 26. 537 – 544.
- Tunquist, B. J., Maller, J. L. 2003. Under arrest: cytoskeletal factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes & Development*. 17. 683 - 710.
- Tsai, Y., Cole, L. L., Davis, L. E., Lockwood, S. J., Simmons, V., Wild, G. C. 1985. Antiviral properties of garlic: *in vitro* effects on influenza B, herpes simplex and coxsackie viruses. *PlantaMed*. 5. 460 - 461.
- Uchida, Y., Takahashi, T., Sato, N. 1975. The characteristics of the antibacterial activity of garlic, *Jpn J. Antibiotics*. 28. 638 – 642.
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2003. USDA national nutrient database for standard reference [online]. [staženo 12. srpna 2014]. Available from World Wide Web ([http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut\\_search.pl](http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut_search.pl)).
- Vacari, S., Weeks, J. L., Hsieh, M., Menniti, F. S., Conti, M. 2009. Cyclin GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of Reproduction*. 81 (3). 595 - 604.
- Van Voorhis, B. J., Moore, K., Strijbos, P. J. L., Nelson, S., Baylis, S. A., Grzybicki, D., Weiner, C. P. 1995. Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide

synthase in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*. 96. 2719-2726.

Vanderhyden, B. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience*. 7. 2006 - 2022.

Velíšek, J. 2002. *Chemie potravin*. 2. díl. Osis Tábor. s. 273.

Vodrážka, P., Hajšlová, J., Hrbek, V. 2013. Charakterizace česneku pomocí hmotnostně spektrometrických metod. Ústav analýzy potravin a výživy. VŠCHT. *Chem. Listy*. 107. 277 – 280.

Wagner, C. T., Durante, W., Christodoulides, N., Hellums, J. D., Schafer, A. I. 1997. Hemodynamic forces induce the expression of heme oxygenase in cultured vascular smooth muscle cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 100 (3). 589 – 596.

Wang, E. J., Li, Y., Lin, M., Chen, L., Stein, A. P., Reuhl, K. R., Yang, C. S. 1996. Protective effects of garlic and related organosulfur compounds on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 136. 146 - 154.

Wang, R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB Journal*. 16 (13). 1792 – 1798.

Wang, R. 2003. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxidants & Redox Signaling*. 5 (4). 493 - 501.

Wargovich, M. J., Goldberg, M. T. 1985. Diallyl sulfide. A naturally occurring thioether that inhibits carcinogen-induced nuclear damage to colon epithelial cells in vivo. *Mutat Res. Jul*. 143 (3). 127 – 129.

Warshafsky, S., Kamer, R. S., Sivak, S. L. 1993. Effect of garlic on total serum cholesterol. A meta-analysis. *Ann Intern Med*. 119 (7). 599 – 605.

Waseem, N., Butt, S. A., Hamid, S. 2014. Amelioration of lead induced changes in ovary of mice, by garlic extract. *Journal of the Pakistan medical association*. 64. 7. 798-801.

Wassarman, P. M. 1988. *The Mammalian ovum. The Physiology of Reproduction*. New York. Raven Press. 2413. 69 -102

- Wassarman, P. M., Albertini, D. F. 1994. The mammalian ovum. In: Knobil, E., Neill, J. D., editors. The physiology of reproduction. 2nd ed. Raven Press. New York. p. 79 – 122. ISBN: 978 – 0781700863.
- Wartenberg, H., 1989. Ultrastructure of fetal ovary including oogenesis. Ultrastructure of Human Gametogenesis and Early Embryogenesis. Electron Microscopy in Biology and Medicine. 61 - 84.
- Wattenberg, L. W., Sporn, V. L., Barany, B. 1989. Inhibition of N - Nitrosodiethylamine Carcinogenesis in Mice by Naturally Occurring Organosulfur Compounds and Monoterpenes. Cancer research. 49. 2689 - 2692.
- Wu, L., Wang, R. 2005. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. Pharmacological Reviews. 57 (4). 585 – 630.
- Xiao, D., Choi, S., Johnson, D. E., Vogel, V. G., Johnson, C. S., Trump, D. L., Lee, Y. J. Singh, S. V. 2004. Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human prostate cancer cells involves c-Jun N-terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase-mediated phosphorylation of Bcl-2. Oncogene. 23. 5594 - 5606.
- Xu, Z. Z., Garverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Hamilton, S. A., Youngquist, R. S. 1995. Expression of follicle-stimulating - hormone and luteinizing-hormone receptor messenger ribonucleic-acids in bovine follicles during the first follicular wave. Biology of Reproduction. 53. 951 - 957.
- Xu, B., Monsarrat, B., Gairin, J. E., Girbal- Neuhauser, E. 2004. Effect of ajone a natural antitumor small molecule on human 20S proteasome activity *in vitro* and in human leukemic HL60 cells. Fundamental & Clinical Pharmacology. 18. 533 – 540.
- Yamada, Y., Azuma, K. 1977. Evaluation of the *in vitro* antifungal activity of allicin, Antimicrob. Agents Chemother. 11. 743 - 749.
- Yanagimachi, R. 1988. Mammalian fertilization. The Physiology of Reproduction. New York. Raven Press. 2413. 135 - 185

- Yokoo, M., Nagahara, T., Kimura, N., Shimizu, T., Matsumoto, H., Sasada, H., Sato, E. 2003. Hyaluronan-CD44 system during cumulus expansion induces oocyte maturation in pig. *Biology of Reproduction*. 68. 325 - 326.
- Yokoo, M., Kimura, N., Sato, E. 2010. Induction of oocyte maturation by hyaluronan - CD44 interaction in pigs. *Journal of Reproduction and Development*. 56. 15 - 19.
- Zenclussen, M. L., Jensen, F., Rebelo, S., El – Mousleh, T., Casalis, P. A., Zenclussen, A. C. 2011. Heme oxygenase – 1 expression in the ovary dictates a proper oocyte ovulation, fertilization and corpora lutea maintenance. *American Journal of Reproductive Immunology*. 67 (5). 376 – 382.
- Zhao, W. M., Zhang, J., Lu, Y. J., Wang, R. 2001. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K - ATP channel opener. *EMBO Journal*. 20 (21). 8428 - 8433.
- Zhu, X. Y., Gu, H., Ni, X. 2011. Hydrogen sulfide in the endocrine and reproductive systems. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 4 (1). 75 - 82.

## 9 Samostatné přílohy

Tabulka 3: Zastoupení aminokyselin v *Allium sativum*

Aminokyselina	Množství v sušině (mg/g-1)
Alanin	0,66-1,37
Arginin	4,50-5,95
Kys. asparagová	1,31-2,36
Cystein	0-0,32
Kys. glutamová	1,63-2,70
Glycin	0,96-1,09
Hystidin	0,61-8,30
Izoleucin	0,24-0,93
Leucin	0,47-1,44
Lyzin	1,05-2,27
Metionin	1,77-2,30
Fenylalanin	0,29-0,86
Prolin	1,05-1,18
Serin	0,83-1,18
Treonin	1,53-10,01
Tryptofan	0,61-1,20
Tyrozín	0,80-1,47
Valin	0,54-2,43

Tabulka 4: Množství vitamínů obsažených v *Allium sativum*

Vitamín	Množství na 100g
A	9 µg
B1	0,2 mg
B2	0,11 mg
B3	0,7 mg
B5	0,596 mg
B6	1,235 mg
B8	23,2 mg
B9	3 µg
C	31,2 mg
E	0,08 mg
K	1,7 µg

Tabulka 5: Obsah minerálních látek v *Allium sativum*

Minerální látka	Množství ( mg/100g)
Na	17
Ca	181
Fe	1,7
P	153
K	401
Zn	1,16
Cu	0,299
Mn	1,672
Mg	25
Se	14,2

Tabulka 6: Hodnocení vlivu S-allyl cysteinu na meiotické zrání oocytů – MI

	K	0,1mM SAC	0,5mM SAC	1mM SAC
GV	6	0	9	2
LD	3	1	2	4
MI	124	127	126	124
AITI	0	3	0	0
MII	0	4	0	0
Dg	1	2	0	3
N	134	137	137	133

K – kontrola; SAC – S-allyl cystein; GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku (germinal vesicle); LD – oocyty ve stádiu pozdní diakineze (last diakinesis), MI – oocyty ve stádiu metafáze I, AI/TI – oocyty ve stádiu anafáze I/telofáze I, MII – oocyty ve stádiu metafáze II, Dg – oocyty s degenerovaným chromatinem, n- celkový počet nasazených oocytů

Tabulka 7: Hodnocení vlivu S-allyl cysteinu na meiotické zrání oocytů – MII

	K	0,1mM SAC	0,5mM SAC	1mM SAC
<b>GV</b>	2	0	4	0
<b>LD</b>	0	0	0	1
<b>MI</b>	1	2	1	3
<b>AI/TI</b>	2	6	3	2
<b>MII</b>	122	120	128	120
<b>Dg</b>	5	2	1	3
<b>N</b>	132	130	137	129

K – kontrola; SAC – S-allyl cystein; GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku (germinal vesicle); LD – oocyty ve stádiu pozdní diakineze (last diakinesis), MI – oocyty ve stádiu metafáze I, AI/TI – oocyty ve stádiu anafáze I/telofáze I, MII – oocyty ve stádiu metafáze II, Dg – oocyty s degenerovaným chromatinem, n- celkový počet nasazených oocytů