

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra veterinárních disciplín



**Syntáza oxidu dusnatého (NOS) a její funkce u kančích
spermií**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Ondřej Halda

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: prof. Mgr. Ing. Markéta Sedmíková, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Syntáza oxidu dusnatého (NOS) a její funkce u kančích spermíí" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4.2018

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval své vedoucí diplomové práce prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D., za odborné vedení, ochotu a pomoc při zpracování práce a Mgr. Marije Jovičíc za cenné rady a pomoc při práci v laboratoři.

Syntáza oxidu dusnatého (NOS) a její funkce u kančích spermii.

Souhrn

Oxid dusnatý (NO) je v buňkách tvořen syntázou oxidu dusnatého (NOS) a je známý pro svou funkci modulátora mnoha fyziologických procesů. I když jeho funkce v lidských a myších spermii byla popsána, informace o funkci NO/NOS v kančích spermii nejsou úplné. Cílem diplomové práce bylo najít izoformy NOS v kančích spermii a zhodnotit efekt NO/NOS na motilitu spermii. Všechny tři izoformy NOS (e-NOS, i-NOS, and n-NOS) byly nalezeny v kančích ejakulovaných i kapacitovaných spermii. Efekt NO/NOS byl hodnocen u spermii inkubovaných při teplotě 17 °C po dobu 72 h. Pro tento účel byly vzorky spermii inkubovány s inhibitory NOS aminoguanidinem (AG) a N ω -nitro-L-arginin hydrochlorid methylesterem (L-NAME) v koncentracích 0,625, 1,25, 2,5, 5, a 10 mM. Kromě toho, byl sledován vliv donoru NO nitroprusidu sodného (SNP) v koncentraci 18,75, 37,5, 75, a 150 μ M. Motilita spermii byla hodnocena po 0 (kontrola), 4, 24, 48, 72 hodinách inkubace. Statisticky významné zvýšení lineární rychlosti (VSL) a průměrné rychlosti na skutečné dráze (VCL) a také zvýšení amplitudy oscilace hlavičky (ALH) bylo pozorováno po 72 hodinách skladování u vzorků ošetřených 0,625 mM AG, pravděpodobně v důsledky antioxidační vlastnosti tohoto inhibitoru. Naproti tomu L-NAME v koncentraci 0,625 mM nevykazoval žádný vliv na parametry kančích spermii po celou dobu inkubace. AG a L-NAME v koncentraci 10 mM negativně ovlivnili kinetiku spermii, což odpovídá dřívějším zjištěním, a to, že nízké hladiny NO jsou nezbytné pro normální funkci spermii. Lze konstatovat, že formulované hypotézy byly potvrzeny a experimenty, které jsou součástí diplomové práce, přispěly k lepšímu porozumění role NO ve fyziologických procesech kančích spermii.

Klíčová slova: oxid dusnatý, syntáza oxidu dusnatého, motilita, kančí spermie, kapacitace

Nitric oxide synthase (NOS) and its role in boar spermatozoa

Summary

Nitric oxide (NO) is generated in cells by nitric oxide synthase (NOS) and it is known as a modulator of several physiological processes. Although its function in human and mouse spermatozoa has been described, there is, nevertheless, limited information concerning the role of NO in boar spermatozoa. The aim of diploma theses was to find NOS isoform in boar spermatozoa and evaluate the effect of NO/NOS on sperm motility. All three NOS isoform (e-NOS, i-NOS, and n-NOS) was found in ejaculated and capacitated spermatozoa. The effect of NO/NOS was evaluated on sperm stored at 17 °C for 72 h. For this purpose, sperm samples were treated with 0.625, 1.25, 2.5, 5, and 10 mM aminoguanidine (AG) or N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME). Moreover, sodium nitroprusside (SNP), a NO donor, was used at the dose of 18.75, 37.5, 75, and 150 μ M. Sperm motility was evaluated at 0, 4, 24, 48, and 72 h of semen storage. A significant increase of the amplitude of lateral sperm head displacement (ALH), and both curvilinear and straight-line velocity (VCL and VSL, respectively) was observed at 72 h of semen storage in samples treated with 0.625 mM AG, probably because of the antioxidant properties of this NOS inhibitor. Contrarily, 0.625 mM L-NAME showed no effect on boar sperm parameters during the entire period of semen storage. Moreover, AG and L-NAME at 10 mM negatively affected sperm kinetics which may provide further support to the notion that low NO levels are necessary for a normal sperm function. It can be stated, that the hypotheses of diploma thesis were confirmed, and the experiments have contributed to a better understanding of the role of NO in the physiological processes of boar sperm.

Keywords: nitric oxide, nitric oxide synthase, motility, boar spermatozoa, capacitation

Obsah

1	Úvod	1
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3	Literární rešerše.....	3
3.1	Spermie.....	3
3.1.1	Morfologie	3
3.1.2	Spermie v samčím reprodukčním traktu	8
3.1.3	Spermie v samičím reprodukčním traktu	11
3.2	Oxid dusnatý.....	17
3.2.1	Vlastnosti a syntéza oxidu dusnatého	17
3.2.2	NOS izoformy	18
3.2.3	Struktura izoforem	19
3.2.4	Význam NO v organismu	20
3.2.5	NOS ve spermích	20
3.2.6	Detekce produkce oxidu dusnatého	21
3.2.7	Vliv NO na oplození	21
4	Materiál a metodika.....	23
4.1	Materiál.....	23
4.1.1	Odběr a zpracování spermií	23
4.2	Metodika	24
4.2.1	Stanovení izoforem NOS	24
4.2.2	Vliv inhibice NOS na motilitu kančích spermií.....	25
4.2.3	Vliv donoru NO na motilitu kančích spermií	25
4.2.4	Kapacitace kančích spermií	26
4.2.5	Hodnocení motility spermií	26
4.2.6	Statistické vyhodnocení	27
5	Výsledky.....	28
5.1	Stanovení izoforem NOS.....	28
5.2	Vliv NO na motilitu kančích spermií.....	30
5.2.1	Vliv inhibice NOS na motilitu kančích spermií.....	30
5.2.2	Vliv donoru NO na motilitu kančích spermií	30
6	Diskuze	34
7	Závěr	36
8	Seznam literatury.....	37

1 Úvod

Oxid dusnatý (NO) patří do skupiny plynných molekul, tzv. gasotransmiterů, které se v buňce podílí na řízení fyziologických procesů. NO vzniká v buňkách reakcí, která je katalyzována syntázou oxidu dusnatého (NOS). Byly popsány tři izoformy syntázy oxidu dusnatého: neuronová (nNOS), endoteliální (eNOS) a indukovatelná (iNOS).

Izoformy NOS byly popsány u spermií různých druhů včetně člověka. Signální dráhy, do kterých jsou NO a NOS zapojené se podílejí na regulaci motility spermií, jejich vitality, kapacity, hyperaktivace, akrozomální reakce i oplození.

Přestože je intracelulární NO nezbytný pro správnou funkci buněk, byl i něj popsán duální efekt působení. Zatímco nízké koncentrace NO obecně podporují průběh fyziologických buněčných procesů, vysoké koncentrace, které vznikají např. při zánětu, mají naopak negativní vliv. Tento efekt platí i pro spermie. Vysoké koncentrace NO přispívají k oxidativnímu stresu a reaktivních formy dusíku (RNS) jsou spolu s reaktivními formami kyslíku (ROS) považovány za hlavní složky oxidativního stresu a jednu z hlavních příčin špatné kvality spermií u lidí. Stres vyvolaný vysokými hladinami ROS a RNS snižuje celkovou a progresivní motilitu spermií, kinetiku a membránový potenciál mitochondrií. Díky duálnímu charakteru působení NO je pole výzkumu funkce NO v buňkách široké navíc se značným aplikačním potenciálem.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Na základě současných poznatků byla stanovena hypotéza, že v kančích spermiích jsou exprimovány izoformy syntázy oxidu dusnatého (NOS) a že se oxid dusnatý (NO) podílí na regulaci motility kančích spermií.

Pro ověření stanovené hypotézy byly definovány cíle práce:

- 1) Stanovit pomocí imunolokalizace izoformy NOS.
- 2) Vyhodnotit pomocí inhibitorů izoform NOS a donoru NO zapojení NO do regulace motility kančích spermií.

3 Literární rešerše

3.1 Spermie

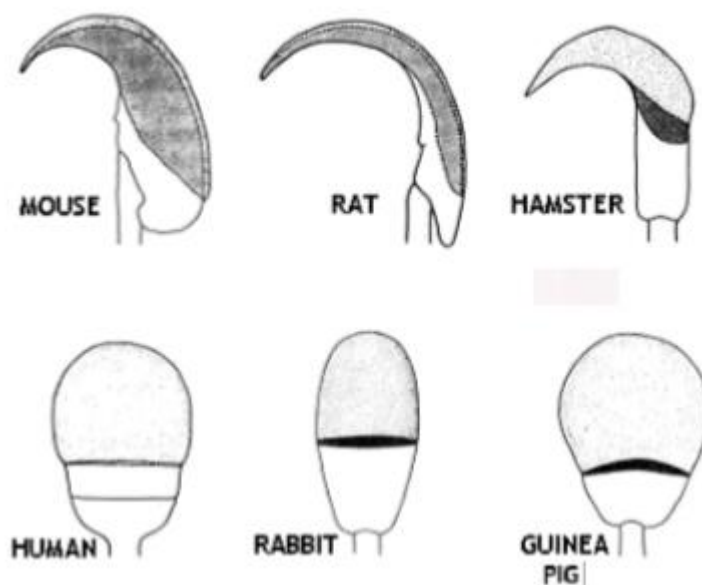
Spermie, samčí pohlavní buňky, vznikají ve varlatech procesem spermiogeneze. Takto vzniklé buňky jsou zpočátku nepohyblivé, bez schopnosti oplození, kterou získají během dalšího procesu zrání v samčím a samičím pohlavním aparátu (Yanagimachi, 1994).

Jedná se o specializovanou buňku, která je svou stavbou uzpůsobena pro předání genetické informace do samičí pohlavní buňky, oocytu. Po splynutí spermie s oocytem následuje fúze prvojadér obou pohlavních buněk a vznik zygoty (Yanagimachi, 1994).

3.1.1 Morfologie

Dvě základní části spermie jsou hlavička a bičík. Hlavička spermie obsahuje jádro, akrozom, cytoplazmu, cytoskelet a proteiny. Jádro spermie obsahuje genetickou informaci. Cytoplazma je v průběhu spermatogeneze z větší části odstraněna společně s organelami (ribozomy, endoplazmatické retikulum), které jsou pro spermii nepotřebné. Proteiny hlavičky jsou důležitou součástí, jelikož se zúčastní rozpoznání a navázání spermie na obaly vajíčka. Funkcí enzymů hlavičky je asistence při pronikání spermie do vaječných obalů. Druhově specificky se hlavička spermie liší velikostí a tvarem (obr. 1). U kanců je pozorován oválný tvar, u člověka kulatý nebo srpkovitý tvar u hlodavců (Yanagimachi, 1994).

Bičík spermie vykonává funkci pohybového aparátu, který slouží k transportu spermie k vajíčku a k následné penetraci vaječných obalů (Yanagimachi).



Obrázek 1: morfologické typy hlaviček (Yanagimachi; 1994)

Jádro

Při porovnání jádra spermie a somatické buňky lze pozorovat určité odlišnosti. Jádro spermie je oproti somatické buňce vybaveno pouze jednou sadou chromozomů. Jádro spermie se dále liší objemem, který je menší, než objem jádra somatické buňky (Sassone-Corsi, 2002). Důvodem je vysoká kondenzace chromatinu jádra, která vzniká vazbou na protaminy. Protamin je specializovaný nukleární protein, který je bazický a obsahuje velké množství argininu a cysteinu. Syntéza mRNA protaminů nastává ve stádiu spermatid a v průběhu spermiogeneze dochází k nahrazování histonů jádra spermie těmito specifickými proteiny (Sassone-Corsi, 2002).

V době epididymální maturace dochází k oxidaci thiolových skupin, obsažených v protaminech, což má za následek vznik disulfidického můstku mezi protaminy. Takto vzniklé disulfidické můstky stabilizují chromatin jádra spermie (Yanagimachi, 1994) a chrání DNA před účinky kyselin, proteináz a DNAáz (Mahi a Yanagimachi, 1976). Není však plně chráněna před oxidativním stresem.

Akrozom

Speciální organela vyskytuje se pouze na spermii a pokrývá přední část jejího jádra. Struktura akrozomu je tvořena vnitřní a vnější membránou (Yanagimachi, 1994). Přední část jádra je pokryta vnitřní akrozomální membránou a vnější akrozomální membrána se nachází v přední části hlavičky spermie, pod plazmatickou membránou. K jádru je akrozom navázán vnitřní akrozomální membránou pomocí akroplaxomu. Jedná se o síť proteinů zahrnující keratin 5 a β -aktin (Kierszenbaum et al., 2011). Velikostí a tvarem je akrozom druhově odlišný a dělí se na ekvatoriální část, která tvoří spodní oblast akrozomu účastnící se fúze spermie a oocyty a na akrozomální čepičku.

Tato membránová organela obsahuje lytické enzymy, jak běžné hydrolázy nacházející se v lysozomech, tak enzymy specifické pro spermatogenní buňky jako je proakrosin nebo hyaluronidáza (glukosidáza), která se však od běžné lysozomální formy liší. Syntéza akrozomálních enzymů začíná již v pachytenním stádiu meiózy v průběhu spermatogeneze, kdy akrozomální váček ještě není vytvořen. Proakrosin je neaktivní forma enzymu, který je syntetizován převážně v kruhových spermatidách, a patří do serin-proteázové superrodiny. V průběhu akrosomální reakce (AR) je proakrosin štěpen a vzniká jeho aktivní forma – akrosin (Yanagimachi, 1994).

K formaci akrozomu dochází během spermatogeneze, kdy se začínají tvořit proakrozomické granula z Golgiho váčku. Tyto granula se následně shlukují a po fúzi tvoří velkou akrozomovou granuli. Dochází ke zvětšování akrozomové granule, díky glykoproteinové syntéze v Golgiho aparátu a následnému nasednutí na jaderný povrch. Akrozom následně houstne a tvoří vnitřní plazmatickou membránu (Abou-Haila a Tulsiani, 2000).

Cytoskelet hlavičky

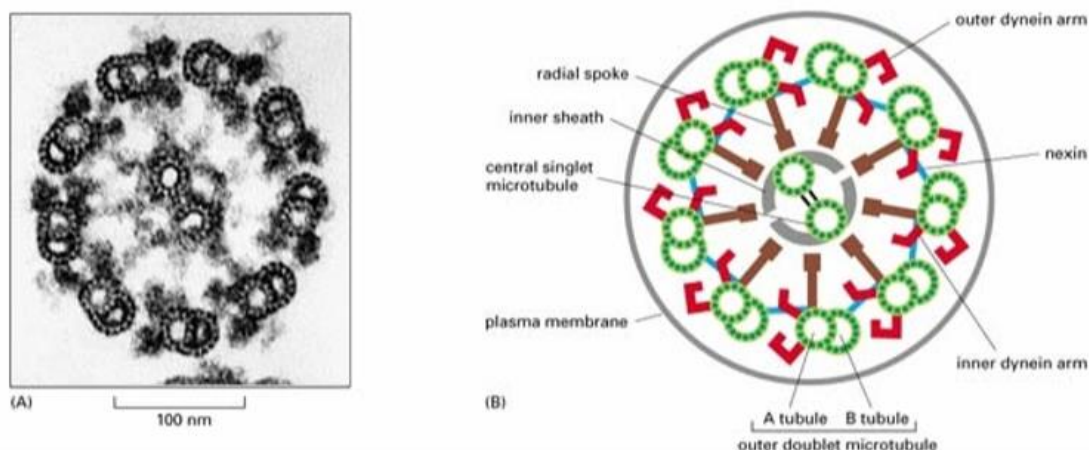
Hlavička spermie obsahuje cytoskelet. Dvojitá funkce cytoskeletu určuje tvarování hlavičky a hraje roli při pronikání spermie do oocyty, přes jeho obaly (Pěkníková et al., 2001). Cytoskeletární strukturu je možno dělit dle její lokalizace do tří částí. Subakrozomální, postakrozomální a parakrozomální cytoskeletární část. Mezi jádrem a akrozomem je lokalizována subakrozomální cytoskeletární část, mezi jádrem a plazmatickou membránou postakrozomální a mezi akrozomem a plazmatickou membránou paraakrozomální cytoskeletární část (Yanagimachi, 1994).

Při formování akrozomu a následnému prodlužování jádra, kompaktu chromatinu, tvorbě bičíku dochází ke vzniku manžety, která obklopuje jádro. Bylo pozorováno složení struktury manžety, která se skládá z mikrotubulárních a aktinových proteinů molekulárních motorů. Tyto proteiny mohou mít vliv na stabilizaci, regulaci a aktivitu motorů vlivem modifikace tubulinu během procesu spermatogeneze a polarizace buňky (Sperry, 2012). Kromě vlivu na tvar hlavičky spermie má manžeta podíl na transportování váčků a makromolekul do cytoplazmy, centrozomu a bičíku směrem z jádra (Kierszenbaum, 2011).

Bičík spermie

Bičík slouží jako pohybový aparát, který umožňuje spermii dosáhnout místo oplození a je složen ze čtyř částí. Jmenovitě část, kde krček spojuje hlavičku a bičík, mitochondriální část, hlavní část a koncová část (Yanagimachi, 1994). Celou délkou bičíku prochází axonema, což je svazek mikrotubulů uvnitř bičíku. Tento útvar, který slouží jako organizační centrum pohybu, vyrůstá z centrioly a je složen ze dvou centrálních mikrotubulů. Tyto centrální mikrotubuly jsou dále obklopené devíti dvojicemi mikrotubulů. Jednotlivé dvojice mikrotubulů jsou spojeny dyneinovými ramínky a tato struktura je nezbytná pro pohyb spermie. Dále je možné pozorovat hustá vnější vlákna, která v celé délce bičíku obalují axonemu (Alberts et al., 2002). Ve střední části bičíku se nacházejí mitochondrie, které tvoří energii pomocí ATP, která je následně využita pro pohyb bičíku (Yanagimachi, 1994). Pomocí hydrolyzace mitochondriálního ATP dyneinovými ramínky dochází k uvolnění energie, což má za následek ohýbání bičíku a pohyb spermie (Alberts et al., 2002).

Nejdelší část bičíku, hlavní, je obklopena fibrilární pochvou, která obaluje hustá vnější vlákna a axonemu. Funkce této pochvy není doposud přesně objasněna, předpokládá se, že se jedná o nositele glykolytických enzymů a signalizačních molekul (Fiedler et al., 2013). Glykolýza je vyžadována pro proces hyperaktivace motility a fosforylace, ke které dochází při kapacitaci spermie (Fiedler et al., 2013). Z tohoto důvodu má fibrilární pochva a její uspořádání vliv na funkčnost spermie (Fiedler et al., 2013).



Obrázek 2: Uspořádání mikrotubulů v bičíku: příčný řez bičíkem pod elektronovým mikroskopem (A); schematické znázornění (B) (Alberts et al., 2002).

Plazmatická membrána

Složení plazmatické membrány spermií není jednotné, jelikož u membrány dochází k rozdělení do částí dle jejich funkce a způsobu napojení na spermii. Plazmatická membrána je z velké části tvořena hlavně fosfolipidy. Dále obsahuje steroly, jmenovitě cholesterol, který ovlivňuje fluiditu membrány (Yanagimachi, 1994).

Hlavička spermie má dvě části: akrozomální a postakrozomální. Akrozomální část se dále skládá z přední akrozomální části, která se nachází v oblasti hlavičky nad akrozomem a ekvatoriální části (Toshimori a Ito, 2003). Molekuly obsažené v akrozomální části plazmatické membrány plní svou funkci v době vazby spermie na zonu pellucidu (ZP) při akrozomální reakci. V membráně postakrozomální a ekvatoriální části jsou obsaženy molekuly, které jsou nutné pro splynutí spermie s vajíčkem. Plazmatická membrána, která se nachází v oblasti bičíku, obsahuje molekuly zahrnuté v aktivitě bičíku (Toshimori a Ito, 2003).

3.1.2 Spermie v samčím reprodukčním traktu

Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces, při kterém dochází k buněčnému dělení a tvorbě samčích gamet, které jsou schopné transportu haploidního genomu k oocytu (Yanagimachi, 1994).

Vývoj spermií je složen z fáze rozmnožovací, růstové a zrání. V první fázi se mitoticky dělí zárodečné buňky (Spermatogonie A), které se nachází na basální membráně semenotvorných kanálků. Tato buňka se následně přesouvá přes bariéru Sertoliho buňky. Dochází k dalšímu mitotickému dělení a vzniku spermatogonie typu B, která již není v kontaktu s basální membránou. Spermatogonie B ve fázi růstu zvyšuje cytoplasmatický objem a mitotickým dělením vzniká spermatocyt I. řádu. Spermatocyt I. řádu obsahuje shodně se somatickou buňkou dvě sady chromozomů. Spermatocyt I. řádu se meioticky dělí za vzniku spermatocytu II. řádu. Spermatocyt II. řádu se dále dělí při druhém meiotickém dělení na čtyři spermatidy, které další dělení nepodstupují. (Yanagimachi, 1994).

Místem vzniku spermií, v průběhu spermatogeneze, jsou semenotvorné kanálky varlat. Zde se spermie tvoří ve vlnách přeměnou primordiálních zárodečných buněk. Pro tvorbu spermií je vyžadována nižší teplota, než je teplota těla. Z tohoto důvodu sestupují varlata do oblasti šourku během embryonálního vývoje. V případě, že varlata nesestoupí, dochází k poruchám při spermatogenezi. Tyto poruchy mají za následek neplodnost samce (Yanagimachi, 1994).

Spermiogeneze

Proces, v jehož průběhu vznikají morfologické změny, které utvářejí konečnou podobou spermie. V těchto změnách je zahrnuto odvrhování přebytečné cytoplazmy ve formě reziduálních tělísek, u kterých dochází k fagocytóze Sertoliho buňkami (de Kretser et al., 1998). Dále se z Golgiho aparátu tvoří akrozom napojený na obal jádra a formuje se bičík. Chromatin jádra prochází kondenzací, kdy je část histonů nahrazena protaminem (Yanagimachi, 1994; Gilbert, 2006). Nastává přerušení spojení cytoplasmatických můstků se Sertoliho buňkami a spermie jsou uvolňovány do lumen semenotvorného kanálku (Herms et al., 2010a).

Epididymální maturace

Spermie ve varleti dosahují morfologické zralosti. Nejsou však schopny úspěšného oplození vajíčka, jelikož nemají schopnost pohybovat se progresivně a vázat se na ZP (Gatti et al., 2004).

Spermie proto podstupují několik dějů, po kterých získávají vlastnosti, které jsou potřebné k úspěšnému oplození. V organismu samce podstupují spermie první zrací děj, při průchodu nadvarletem. Změny, které zde spermie prodělají a získají oplozovací schopnost se označují jako epididymální maturace.

Spermie jsou transportovány ze semenotvorných kanálků skrze tubuli recti, rete testis a ductuli efferents. Změny, kterými spermie procházejí během epididymální maturace zajišťují, že je plasmatická membrána spermie stabilizována, je zabráněno předčasné akrozomální reakci a jsou ochráněny receptory umožňující vazbu se ZP (Gatti et al., 2004).

Nadvarle tvoří stočený kanálek a anatomicky se dělí do tří částí. Hlava (*caput*), tělo (*corpus*) a ocas (*cauda*). Ocas nadvarlete, který nasedá na rete testis a ústí do vas deferens, slouží jako zásobárna zralých spermií, které jsou připraveny k ejakulaci.

Doba uchování spermií v nadvarleti závisí na druhu živočicha a pohybuje se v řádu několika dní až týdnů (Yanagimachi, 1994). Obecně platí, že spermie získávají oplozovací schopnost v ocasu nadvarlete, kde dochází k jejich skladování. U kanců je však možno nalézt oplození schopné spermie v hlavě nadvarlete a např. u lidí se zralé spermie objevují v *corpusu* (Yanagimachi, 1994).

V nadvarleti je utvářeno prostředí, které je izolováno od krevního oběhu, se specifickými vlastnostmi jako jsou teplota, pH, tenze kyslíku, skladba iontů. Toto prostředí je důležité pro proces zrání spermií (Dacheux et al., 2003). Vysoká koncentrace iontů Zn^{2+} je charakteristická pro prostředí nadvarlete, jelikož se zde podílí na dospívání spermií (Frenette et al., 2001).

Na epitelových buňkách nadvarlete se nacházejí mikrokylky, které interagují se spermiemi, které procházejí kanálkem. Lumen nadvarlete je vyplněno tekutinou. Tekutina nadvarlete se vyznačuje vysokou absorpční a sekreční aktivitou a její složení je rozdílné v každé části nadvarlete. Segmentace nadvarlete ovlivňuje funkci a morfologii epitelálních buněk (Belleannée et al., 2012).

Molekuly plazmatické membrány se při průchodu nadvarletem mění např. glykosylací, maskují nebo jsou odstraněny. Při glykosylaci popř. deglykosylaci dochází k enzymatické úpravě proteinů, které tvoří plazmatickou membránu spermie (Dacheux et al., 2003). Je zvyšován záporný náboj membrány a nastávají změny ve schopnosti vázat lektin (Saxena et al., 2002). Během průchodu spermií se taktéž adsorbují a včleňují nové molekuly, které se syntetizují v nadvarlatech.

Sekretované proteiny se buď naváží na složky plazmatické membrány nebo jsou zabudovány do subcelulární domény nebo mají chování integrálních proteinů nebo jsou vázány GPI kotvou (Zhang a Martin-Deleon, 2003). Část proteinů se váže elektrostatickou interakcí a jsou přichyceny na povrch spermie.

Jako další příklad molekuly k jejíž sekreci dochází v nadvarletí, je uváděn cholesterol, který se včleňuje do plazmatické membrány spermie, díky čemuž je zajištěna její stabilizace (Yanagimachi, 1994). Další molekuly, k jejichž sekreci dochází v nadvarletí zajišťují přežití v samičím reprodukčním traktu nebo se účastní procesu navázání spermie na ZP (Yanagimachi, 1994).

Jak bylo popsáno výše, větší část proteinů obsažených v tekutině jsou produktem sekrece nadvarlat. Sekrece probíhá apokrinně, kdy jsou tvořeny malé membránové váčky, epididymosomy. Epididymosomy se svým složením liší od proteinů které se nachází v epididymální tekutině (Frenette et al., 2001). Předpokládá se, že se epididymosomy účastní eliminace poškozených spermií spojením ubiquitinu a povrchu spermie, za vzniku fagocytózy (Sutovsky et al., 2001).

Spermie nacházející se ve varlatech nemají schopnost pohybu nebo je pohyb velmi omezený. Schopnost pohybu spermií tedy zajišťuje proces epididymální maturace. Spermie, které prodělali epididymální maturaci jsou pohyblivé a mají schopnost oplodnit vajíčko v in vitro prostředí v případě, že prošli procesem kapacitace a akrozomální reakce. Aby byly spermie schopné oplodnit vajíčko v in vivo prostředí, musí dojít k navázání na ZP, akrozomální reakci, průniku obaly oocyty a společné fúzi (Baldi et al., 2002).

Pro spermie je nutné přežití po určitý čas v prostředí samčího reprodukčního traktu, aby mohlo dojít k procesu kapacitace, po kterém se spermie stane plně fertilní a získá schopnosti nutné pro oplození oocyty (Visconti et al., 1998a).

3.1.3 Spermie v samičím reprodukčním traktu

Po kopulaci a následné ejakulaci dochází ke vstupu spermií do samičího reprodukčního traktu. Zde spermie prodělají dva další nezbytné maturační děje. Kapacitaci a akrozomální reakci. Tyto maturační děje musí proběhnout, aby posléze došlo k úspěšnému oplození oocyty. Jakákoliv porucha maturačních dějů vede k selhání spermií při oplození (De Jonge, 2005).

V závislosti na živočišném druhu je v ejakulátu obsaženo několik desítek až stovek miliónu spermií schopných pohybu. Značná část spermií je zastavena děložním krčkem a hlenem. Do dělohy vstupují spermie, které jsou morfologicky bez defektu, jsou schopny progresivního pohybu a mají fungující plazmatickou membránu, která je schopna reagovat na prostředí dělohy. Spermie putují z dělohy do vejcovodů a jenom malé množství je schopno dosáhnout na povrch ZP. V konečné fázi oocyt oplodní jedna spermie (De Jonge, 2005).

Ovidukální rezervoár

Po vstupu do reprodukčního traktu samice začnou na spermie působit bariéry ve formě imunitní reakce s pohlavním ústrojím a hlenu děložního krčku. Hlen je první formou selekce spermií při jejich transportu k oocyty. Funkcí hlenu je zabránit morfologicky nedokonalým spermiím, které nemají dostatečnou motilitu, ve vstupu (Barros et al., 1988).

Při následném průchodu dělohou, je spermiím pohyb ve směru k vejcovodům usnadněn pomocí kontrakcí svalů dělohy, které jsou vyvolávány složkami ejakulátu (Kunz et al., 1996). Z důvodu rychlého průchodu dělohou nejsou spermie dlouhodobě vystavovány reakci imunitního systému v pohlavním ústrojí samice a je jim tak umožněno přežít delší dobu.

V istmické části vejcovodu, se po průchodu spermií dělohou tvoří ovidukální rezervoár. Rezervoár slouží jako zásobárna spermií, než nastane doba ovulace vajíčka. Díky ovidukálnímu rezervoáru je možná synchronizace dozrání spermií s uvolněním oocyty. Tvorba ovidukálního rezervoáru je umožněna díky lektinovým vazbám. Proteiny, které pokrývají povrch spermií jsou navázány na sacharidové komponenty epitele oviduktu (Töpfer-Petersen et al., 2002). Tyto lektinové vazby jsou druhově specifické (Talevi a Gualtieri, 2010).

Ovidukální rezervoár je dalším selekčním místem spermií a dochází zde k začátku kapacitace. Předpokládá se, že k uvolnění spermií rezervoárem dochází díky hormonálnímu impulzu při ovulaci. Dochází ke změně složení ovidukální tekutiny a díky tomu následuje stimul spermií ke kapacitaci (Hunter, 1996). Díky následnému regulovanému uvolňování kapacitovaných spermií do vejcovodu je bráněno vzniku polyspermie (Hunter, 1996).

Kapacitace

Při kapacitaci nastávají ve spermii, která se nachází v pohlavním ústrojí samice nebo v in vitro podmínkách, regulované biochemické a biofyzikální změny. Nezávisle na sobě byla poprvé doložena nutnost kapacitace a jejího vlivu na úspěšnost oplození oocyty v roce 1951 (Chang 1951; Austin 1951).

Během kapacitace dochází k odstranění dekapacitačních faktorů, což jsou látky stabilizující membránu spermie. Následkem odstranění těchto faktorů jsou spermie více citlivé na prostředí během fertilizačního procesu (Yanagimachi, 1994). Hormonální stav samice a kvalita ejakulátu ovlivňuje rychlost průběhu kapacitace.

Spermie jsou uloženy v isthmu oviduktu, dochází-li ke kopulaci před ovulací. Zde jsou spermie navázány na epitel vejcovodu a dochází k tvorbě oviduktálního rezervoáru (Smith et al., 1987; Yanagimachi a Chang, 1963). Díky této vazbě je udržena stabilita plazmatické membrány, následkem čehož se zpomaluje kapacitace, ale na druhou stranu se prodlužuje životaschopnost spermií. K urychlení kapacitace a k dřívějšímu vypuštění spermií z isthmu dochází, pokud kopulace nastala po ovulaci oocyty. Důvodem je, aby spermie dosáhli oocyty ve vhodné chvíli pro oplození (Yanagimachi, 1994).

Uchování spermií je závislé na živočišném druhu. U některých druhů vzniká vazba spermií na epitel vejcovodu ve spodní části isthmu a tvoří se oviduktální rezervoár. U jiných živočišných druhů, např. u člověka dochází k uchování spermií nejdříve v cervikálním hlenu a následně vzniká oviduktální rezervoár (Yanagimachi, 1994).

Funkcí cervikálního hlenu je ochrana spermií v prostředí pochvy, kde dochází k jejich fagocytóze. Cervikální hlen také zabraňuje semenné plazmě ve vstupu do dělohy a je schopen odstraňovat spermie s morfologickým defektem (Chretien, 1977).

Spermie jsou z rezervoáru uvolněny při ovulaci. Isthmus a jeho spodní část je velmi citlivý na hormonální změny, jelikož obsahuje mnoho adrenoreceptorů a krev, která proudí přes utero-tubální arterii je bohatá na hormony vaječníku (Hunter et al., 1983). Následkem změn probíhajících v plazmatické membráně hlavičky spermie, během kapacitace a hyperaktivace motility, dochází uvolňování spermií z isthmu (Yanagimachi, 1994).

Spermie jsou následně transportovány přes lumen vejcovodu do ampuly, která je místem oplození oocyty. Ke kapacitaci dochází ve spodní části isthmu. Spermie neprocházejí kapacitací najednou, ale postupně. Dochází tak k postupnému uvolňování z oviduktálního rezervoáru (Yanagimachi, 1994). Jedná-li se o druh, který skladuje spermie nejdříve v cervikálním hlenu, dochází k začátku kapacitace již zde (Yanagimachi, 1994).

V průběhu kapacitace se zvyšuje fluidita plazmatické membrány, jelikož dochází ke změně koncentrace intracelulárních iontů. Dále se mění složení lipidů a fosfolipidů plazmatické membrány a jejich distribuce (Lamirande et al., 1997).

Dochází odstranění proteinů integrovaných v semenné plazmě (dekapacitační faktor a caltrin) a v nadvarlatech (akrozom stabilizující protein) (Yanagimachi, 1994). Semenná plazma dále obsahuje adenosin, „fertilization promoting peptid“, kalcitonin a angiotensin II. Tyto komponenty jsou nutné pro to, aby byla správně načasována kapacitace a akrozomální reakce (Fraser et al., 2006a). Funkcí těchto látek je spuštění signální kaskády vazbou na receptor, což má za následek produkování c-AMP. Z důvodu předčasné akrozomální reakce, která je nežádoucí, musí být hladina c-AMP regulována, jelikož zvýšení její hladiny koreluje s navozením kapacitace a akrozomální reakce. Komponenty semenné plazmy proto brání předčasnému vzniku akrozomální reakce snižováním produkovaného c-AMP ve spermiích, které prodělali kapacitaci (Fraser et al., 2006a). Mezi regulátor kapacitace patří enzym fosfodiesteráza, jehož funkcí je štěpit c-AMP na metabolit 5'AMP, který není aktivní (Fraser et al., 2006a).

Kromě toho, že jsou některé komponenty membrány odstraňovány, další mohou být skryty nebo se stát přístupnými pro okolní prostředí, čímž dochází k odkrytí povrchových receptorů, které jsou nutné při rozpoznávání a vazbě spermie na ZP (Abou-haila a Tulsiani, 2009). Plazmatická membrána spermií, které se zúčastnili ejakulace, je více stabilní, díky navázaným složkám semenné plazmy (glykoproteiny, polypeptidy, dekapacitační faktor). Díky tomu mají větší rezistenci vůči kapacitaci než epididymální spermie (Yanagimachi, 1994). Děj kapacitace je dále spojován se zvýšenou fosforylací proteinů tyrosinových, serinových a threoninových zbytků, zvýšeným metabolismem a s hyperaktivovanou motilitou (Baldi et al., 2002).

Hyperaktivace je brána jako součást kapacitace, její regulace je však odlišná (Marquez a Suarez, 2004). Dochází ke změně pohybu bičíku, jejíž následkem je snadnější uvolňování spermií z oviduktálního rezervoáru a snadnější průnik obaly oocyty (Suarez a Pacey, 2006). Spermie po hyperaktivaci snadněji a rychleji proniknout kumulárními buňkami oocyty a zonou pelucidou. Bylo zjištěno že blokací hyperaktivace kapacitované spermie, která dokončila akrozomální reakci, je znemožněn průnik do vajíčka (Stauss et al., 1995).

V plazmatické membráně spermií musí být udržován iontový gradient jako v jiných buňkách. Epididymální spermie mají ze začátku vysokou intracelulární koncentraci K^+ (120 mM) a nízkou intracelulární koncentraci Na^{2+} (14 mM). Průběžně s kapacitací dochází ke změně iontového prostředí. Intracelulární koncentrace sodíku, vápníku a bikarbonátu je vyšší, což má za následek zvýšení pH v buňce. Koncentrace iontů draslíku, zinku a chlóru je nižší (Yanagimachi, 1994). Následkem vyšší koncentrace vápníku a bikarbonátu je aktivována adenylát cykláza (Baldi et al., 1996). Aktivace adenylát cyklázy má za následek produkci c-AMP, která aktivuje c-AMP dependentní protein kinázu A (PKA).

PKA aktivuje enzym skramblázu (Harrison a Gadella, 2005), která je zodpovědná za distribuci fosfolipidů ve vnějším a vnitřním listu plazmatické membrány a umožňuje snadnější odstranění membránového cholesterolu (Harrison a Gadella, 2005).

Zvýšená fluidita membrány v oblasti hlavičky a bičíku je umožněna díky změnám na membráně spermie. Cholesterol je odstraňován pomocí albuminu a HDL a membrána je tak více přístupná pro částice které vážou lipidy (Abou-haila a Tulsiani, 2009). Akrozomální oblast plazmatické membrány spermií, které neprodělali kapacitací, se vyznačuje vysokou koncentrací cholesterolu. Po ukončení kapacitace se tato koncentrace snižuje, dále jsou produkovány fúzogenní složky a spermie je připravována na akrozomální reakci (Yanagimachi, 1994). Po aktivaci PKA dochází k fosforylaci tyrosin kinázy na serinovém a threoninovém zbytku, což má za následek aktivaci této kinázy. Následuje fosforylace dalších proteinů na tyrosinovém zbytku tyrosin kinázou (Baldi et al., 1996). Fosforylace proteinů tyrosin kinázou je typickou postranlační modifikací proteinů během kapacitace a akrozomální reakce. Tato modifikace je důležitá z hlediska signalizačních dějů ve spermii, jelikož DNA je v buňce vysoce kondenzována a nemá možnost ovlivnit syntézu nových proteinů (Baldi et al., 1996). v Průběhu kapacitace dochází k fosforylaci proteinů o váze 95, 51 a 75 kDa (Baldi et al., 1996).

Akrozomální reakce

Akrozomální reakce (AR) je klíčový maturační děj při splývání spermie a oocyty. Po kontaktu vnějších obalů oocyty s kapacitovanými spermii dochází ve spermii k aktivaci proteinů a signálních kaskád, následkem čehož je exocytóza akrozomálního váčku, tedy akrozomální reakce (Florman et al., 2004).

V průběhu exocytózy jsou uvolňovány intraakrozomální enzymy a jsou odkrývány nové membránové domény, jelikož se vnitřní akrozomální membrána dostává na povrch hlavičky spermie v anteriorní oblasti. Proteiny, které se váží na vnitřní akrozomální membránu se účastní vazby spermie na plazmatickou membránu oocyty, při následné fúzi membrán spermie a oocyty nebo při exocytóze kortikálních granul.

Savčí oocyt obklopuje glykoproteinový obal, který se označuje ZP. Po ovulaci se tvoří další obal z kumulárních buněk složený z jejich matrix, který obsahuje polymerizovanou hyaluronovou kyselinu. Pro následnou fúzi spermie s membránou oocyty je nutné proniknutí touto bariérou. Bylo zjištěno, že proniknutí skrze tyto obaly následné fúze s plazmatickou membránou oocyty je možné jenom v případě, že spermie prodělala akrozomální reakci (Yanagimachi, 1994). Dále bylo pozorováno, že u spermie není možné navození akrozomální reakce spontánně ani po indukci ligandem, v případě že neproběhl kapacitační proces (Yanagimachi, 1994).

Dlouhodobě byl přijímán fakt o iniciaci akrozomální reakce, která vzniká při kontaktu spermie se ZP a jejím následným navázáním na ZP3 protein (Yanagimachi, 1994; Baldi et al., 2002). Jin et al. (2011) prokázali, že většina myších spermií, které jsou schopné oplození, iniciuje AR při průniku extracelulárním obalem oocyty (cumulus oophorus). Následně byla prokázána schopnost průchodu skrz ZP a následné oplození oocyty u spermií, u kterých byla AR indukována v průběhu penetrace extracelulárního obalu oocyty (Jin et al., 2011).

I přes průkaz schopnosti spermií, u kterých proběhla AR, projít ZP (Huang et al., 1981; Myles et al., 1987) stále nebylo zjištěno, čím je iniciována AR v průběhu průchodu spermie přes cumulus oophorus. O hormonu progesteronu, který je sekretován kumulárními buňkami, se spekuluje jako o možném iniciátoru AR. Přes dohady, zda dochází k aktivaci AR při kontaktu spermie s cumulus oophorus nebo při vazbě na ZP, může oocyt oplodnit pouze spermie, u které proběhla akrozomální reakce.

Obecně přijímaný mechanismus signální dráhy AR po navázání na ZP3 protein pokračuje zvýšením koncentrace vápníkových kationtů, které jsou transportovány skrze vápenaté kanály. Při zvýšené intracelulární koncentraci vápníkových kationtů následuje aktivace adenylát cyklázy (AC), fosfolipázy C (PLC) a fosfolipázy A2 (PLA2). Po aktivaci začíná AC produkovat c-AMP, díky kterému dochází k aktivaci protein kinázy A (PAK). Aktivací PLC dochází k produkci Inositol-3-fosfátu (IP3) a diacylglycerolu (DAG), které fungují jako fyziologické aktivátory protein kinázy C (PKC). Funkcí PKA a PKC je fosforylace proteinů, které jsou potřebné při AR. Po aktivaci PLA2 je štěpen fosfatidylcholin a vzniká lysofosfatidylcholin a kyselina arachidonová (Baldí et al., 2002). Při zvyšování koncentrace vápníkových kationtů a pH probíhá souběžně depolymerizace F-aktinu za vzniku monomerního G-aktinu. Depolymerizací F-aktinu dochází k přiblížení akrozomální a plazmatické membrány, jelikož bariéra mezi těmito membránami je tvořena právě F-aktinem (Herms et al., 2010c). Spojením produkce a depolymerizace F-aktinu následně vzniká akrozomální reakce (Abou-haila a Tulsiani, 2009).

V akrozomu je obsaženo velké množství enzymů např. proteinasa akrosin, hyaluronidasa, fosfatasa, β -galaktosidasa, neuraminidasa, fosfolipasa a další (Yanagimachi, 1994). Kapacitace a AR jsou tedy na sobě závislé děje, jelikož dosáhnutí AR je možné pouze u spermií, u kterých došlo k plné kapacitaci.

Progesteron

Jak bylo zmiňováno výše, progesteron je v současné době považován za možný ligand zodpovědný za spuštění AR při průchodu spermie skrz extracelulární obal oocyty. I přesto však nebyla přesně určena molekula, která je za aktivaci AR průchodem přes *cumulus oophorus* odpovědná.

Progesteron je produkován kumulárními buňkami, které i po ovulaci obklopují v několika vrstvách (2-3 vrstvy) oocyt, a které tvoří vnější obal oocyty. Následně je progesteron sekretován do extracelulárního prostoru kumulárních buněk (Serrano a Garcia-Suarez, 2001). Několik studií prokazuje vazbu progesteronu na receptory, které se nacházejí na plazmatické membráně spermie, v průběhu průniku přes *cumulus oophorus* a dále spuštění signální dráhy, která má za následek alkalizaci cytosolu v hlavičce spermie (Serrano a Garcia-Suarez, 2001). Benoff (1998) poukazuje na neschopnost progesteronu samostatně iniciovat AR v *in vivo* podmínkách, i když podle Osman et al. (1989) je progesteron při vysoké koncentraci schopen iniciace AR. Harper et al. (2004), Florman et al. (2004) a Teves et al. (2009) předpokládají, že progesteron se spíše zúčastňuje chemotaxe a řízení motility spermie.

3.2 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) patří do skupiny malých, plynných molekul, takzvaných gasotransmitterů. Gasotransmittery jsou v současné době předmětem studií z důvodu jejich funkce jako signálních molekul v buňce (Wang, 2004). K syntéze gasotransmitterů dochází v buňce pomocí enzymu syntázy oxidu dusnatého (NOS). Mezi vlastnosti gasotransmitterů patří snadná prostupnost plasmatickými membránami a autokrinní, endokrinní nebo parakrinní efekt (Wang, 2004). Díky objevu vazodilatačního vlivu NO na kardiovaskulární systém, za který byla udělena Nobelova cena za fyziologii v roce 1998, se stal NO předmětem zájmu a výzkumu v oblasti fyziologie a medicíny (Kupková a Beneš, 2004).

3.2.1 Vlastnosti a syntéza oxidu dusnatého

Oxid dusnatý je volný radikál, který je schopen průniku přes buněčné membrány, a který je tvořen nepolární dvouatomovou molekulou s krátkým biologickým poločasem rozpadu (v průměru tři až pět sekund) (Garthwaite, 1991) s maximální rozpustností ve vodě, která je srovnatelná s rozpustností, jakou má čistý kyslík (Dixit a Parvizi, 2001). Při reakci NO_2 s NO se tvoří oxid dusitý, který má schopnost nitrosylace proteinů. Nitrosylace je jedním ze způsobů modifikace proteinů (Stamler et al., 1994). Nitroso-thiol plní funkci jako nosič NO (Furchgott a Zawadzki, 1980). Byl pozorován vznik dusitanů v průběhu rozkladu NO. Následně dochází k oxidaci dusitanů na dusičnany, pokud se nacházejí v přítomnosti hemoproteinů (Kupková a Beneš, 2004). výskyt dusitanů a dusičnanů je možné stanovit pomocí spektrofotometrie a následně tak využít pro nepřímé stanovení NO (Kupková a Beneš, 2004). Mezi další reakce patří reakce superoxidu s NO, po které následuje vznik peroxodusitanu (OONO-), který je toxický a má schopnost oxidace bílkovinových SH skupin. Dále má schopnost poškozovat DNA a vyvolávat apoptózu. Při reakci NO s volnými radikály kyslíku dochází ke vzniku dalších toxických radikálů, které mají za následek poškozování tkáně a tvorbu chronického a akutního zánětu (Clementi et al., 1998). NO se zúčastňuje intracelulární i extracelulární signalizace (Petr et al., 2005) a slouží jako biologický posel (Dixit a Parvizi, 2001).

K syntéze oxidu dusnatého v buňce dochází díky katalytickému působení enzymu syntázy oxidu dusnatého (NOS) (Nathan a Xie, 1994). Katalytickým působením NOS dochází ke vzniku L-citrulinu přeměnou L-argininu. Souběžně dochází ke vzniku molekuly NO (Bu et al., 2003). V průběhu reakce je vyžadován nikotinamidadenin dinukleotid fosfát (NADPH) a kyslík (Romero-Aguirregomez-corta et al., 2014). K lokalizaci NOS došlo nejdříve ve vaskulárním endotelu, mozku a v makrofázích.

3.2.2 NOS izoformy

NO-syntáza (NOS) je enzym, který se vyskytuje v buňkách organismu ve formě tří základních izoform. Izoformy jsou odlišovány podle jejich funkce, lokalizace, kinetiky a způsobu, jakým jsou aktivovány (Kupoková a Beneš, 2004).

Neuronová konstitutivní NO-syntáza

Nervová tkáň bylo první místo, ve kterém byla tato izoforma (nNOS, NOS-I, typ I, NOS-1) objevena (Bredt et al., 1990). Později došlo k identifikaci nNOS v místech, jako jsou kosterní svalovina, beta buňky pankreatu, hypofýza, dřev nadledvin, samčí reprodukční orgány, ledvinové nefrony (Dixit a Parvizi, 2001).

Gen pro nNOS je složen z 29 exonů a 28 intronů (Dixit a Parvizi, 2001). U člověka je tento gen lokalizován na dvanáctém chromosomu a monomer proteinu dosahuje hmotnosti 131 kDa.

nNOS produkuje NO v malém množství a konstitutivní exprimace enzymu znamená, že přítomnost v buňce je ve stálé koncentraci. K aktivaci této izoformy dochází při vzestupu koncentrace intracelulárních kationtů vápníku. Při vazbě kationtů vápníku na kalmodulin vzniká komplex kalmodulin/ Ca^{2+} , který má za následek aktivaci nNOS (Janssens et al., 1992)

Endotelilální konstitutivní NO-syntáza

Poprvé byla tato izoforma (eNOS, typ III, NOS-III, NOS-3) lokalizována v buňkách cévního endotelu (Bredt et al., 1990, Alderton, 2001). Následně byla eNOS popsána v savcích folikulech vaječníků (Jablonka -Shariff a Olson, 1997). K lokalizaci v oocytech primordiálních folikulů došlo v roce 2006 (Hattori a Tabata, 2006). Ambrosino (2003) našel u samců eNOS v Sertolihových, Leydigových a endotelilálních buňkách. eNOS obsahují i spermatické buňky (Ambrosino et al., 2003).

Izoforma eNOS se skládá z 26 exonů a 25 intronů (Dixit a Parvizi, 2001). Gen, který kóduje tuto izoformu, je u člověka umístěn na 7. chromosomu a protein dosahuje hmotnosti 133 kDa (Janssens et al., 1992).

eNOS se funkcí podobá nNOS. Je kalcium/kalmodulin dependentní a exprimace enzymu je také konstitutivní. eNOS je aktivována přítomností kationtů vápníku a následně je produkován NO v malém množství v krátké době, v reakci na různé stimuly (Dixit a Parvizi, 2001) např. při hemodynamickém stresu nebo při poškození nervů (Hattori a Tabata, 2006).

Indukovatelná NO-syntáza

K objevu této izofomy (iNOS, typ II, NOS-II, NOS-2) došlo v myším makrofágu. K exprimaci iNOS dochází dále v celé řadě buněk, jak jsou hepatocyty, hladkosvalové buňky, fibroblasty, buňky Langerhansových ostrůvků pankreatu, epiteliální buňky, neutrofilní granulocyty, chondrocyty, keratinocyty a buňky respiračního epitelu (Nathan a Xie, 1994). Důsledkem exprimace je reakce na zánětlivé cytokiny a lipopolysacharidy (Romero-Aguirregomez et al., 2014). iNOS byla popsána i v savčích folikulech vaječníku. Produkce NO je díky iNOS, stálá a dlouhodobá (Jablonka-Shariff a Olson, 1997).

V iNOS je oproti nNOS a eNOS obsažen pevně vázaný kalmodulin s vápníkem (Hattori a Tabata, 2006). Isoforma iNOS není dependentní na vápníku a kalmodulinu a je schopna vyprodukovat 100 až 1000krát více NO, oproti konstitutivním izoformám nNOS a eNOS (Dixit a Parvizi, 2004). V důsledku velmi pevné vazby v iNOS, je kalmodulin považován spíše za podjednotku izofomy, než za její kofaktor (Dixit a Parvizi, 2004, Hattori a Tabata, 2006).

Kódující gen pro iNOS je složen z 26 exonů a 25 intronů. U lidí iNOS produkuje gen, který se nachází na 17. chromosomu a protein dosahuje molekulové hmotnosti 133 kDa (Dixit a Parvizi, 2001).

3.2.3 Struktura izoforem

Každá ze tří izoforem je tvořena strukturou homodimerů, což znamená, že jsou složeny ze dvou identických monomerů (Alderton et al., 2001) a dále se dělí dle funkčnosti na N-terminální oxidázovou doménu a C-terminální reduktázovou doménu (Hattori a Tabata, 2006). Oxidázová doména se nachází na amino konci monomeru, kde váže L-arginin, tetrahydrobiopterin (BH₄) a hemovou skupinu (Groves a Wang, 2000). Hemová skupina funguje jako reakční centrum pro oxidační reakci (Groves a Wang, 2000). Na reduktázové doméně, která leží na karboxylovém konci, se nacházejí vazebná místa redukčních kofaktorů nikotinamidadenin dinukleotidfosfátu (NADPH), flavin mononukleotidu (FMN), flavin adenin dinukleotidu (FAD) a kalmodulinu (CaM) (Groves a Wang, 2000). Na reduktázové doméně dochází k přenosu elektronů z NADPH na hem (Hattori a Tabata, 2006). Přenos elektronů je ovlivňován kalmodulinem, který spouští funkce NOS (Stuehr et al., 1999), a který spojuje obě domény přes kalmodulin rozpoznávací místo (Alderton et al., 2001).

3.2.4 Význam NO v organismu

NO funguje jako signální molekula a v organismu se uplatňuje při různých dějích (Dixit a Parvizi, 2001). Například pozitivně účinkuje v kardiovaskulárním systému, jelikož je schopen navodit vazodilataci hladké svaloviny pomocí cyklického guanosin-mono-fosfátu (cGMP). NO se naváže na železo hemu a cysteinový zbytek v blízkosti hemové skupiny v guanylát cykláze. Díky interakci NO s hemovým železem dochází k uvolňování histidinu, což má za následek enzymovou aktivaci guanylát cyklázy. Guanylát cykláza v buňce mění guanosintrifosfát (GTP) na cyklický guanosinmonofosfát (cGMP). cGMP následně sníží koncentraci kationtů vápníku uvnitř buňky. V důsledku nízkému obsahu kationtů vápníku následuje uvolnění hladkého svalstva.

NO je společně s iNOS součástí nespecifické imunitní obrany, působící proti bakteriím, virům a nádorům. Účastní se procesů fagocytózy a zánětlivých reakcí, vyvolává tvorbu antivirového interferonu γ . Dále udržuje napětí svalu cév a krevního tlaku, zabraňuje přilnutí a shlukování trombocytů, snižuje aktivaci leukocytů a má antiproliferační účinek (Kupková a Beneš, 2004).

V CNS působí jako neurotransmitter pomocí aktivovaného cGMP. Na NMDA receptory působí glutamát, což má za následek zvyšování koncentrace vápníkových kationtů. Zvýšením koncentrace vápníkových kationtů je aktivována nNOS, která produkuje NO, důsledkem čehož je vzestup hladiny cGMP a zpětná difúze NO do presynaptického neuronu. Podle Eu et al. (2000) by tedy paměťová stopa v CNS mohla vznikat díky účasti cGMP a NO. Pokud však vzniká nadbytečné množství NO, dochází k neurotoickým účinkům. K těmto účinkům dochází při reakci NO se superoxidem, jelikož následně vzniká peroxodisitan, který je toxický. Tato reakce poškozuje DNA a dochází k apoptóze buňky (Kupková a Beneš, 2004).

3.2.5 NOS ve spermích

NOS izoformy byly detekovány ve spermích různých druhů savců. Například Herrero (1996) a Lewis (1996) prokázali přítomnost NOS ve spermích člověka a myši. Meiser a Schulz (2003) detekovali NOS izoformy u býků. Kim et al. (2007), Ambrosino et al. (2003), Aquila et al. (2011) detekovali NOS izoformy u kanců. U myši byla NOS pozorována v akrozomu a v bičíku nekapacitované spermie. Předpokládá se vliv NOS na kapacitaci, jelikož se během inkubace v kapacitačních podmínkách snižovalo množství lokalizované NOS (Herrero et al., 1996). Na druhou stranu u spermíí člověka byly nNOS a eNOS pozorovány na ekvatoriálním a postakrozomálním segmentu, ale už ne na bičíku (Lewis et al., 1996).

3.2.6 Detekce produkce oxidu dusnatého

V in vivo podmínkách je NO produkován v malém množství a dochází k jeho rychlé reakci látkami jako jsou kyslík, thiol nebo hemoglobin. Poločas rozpadu NO se v průměru odhaduje na 3 až 5 sekund (Kupková a Beneš, 2004). Bylo popsáno několik metod pro detekci produkce NO v různých tkáních, Tyto metody zahrnují měření aktivity NOS sledováním konverze L-argininu na L-citrulin (Bredt a Snyder, 1989). Dále detekce konečných produktů NO jako jsou nitráty a nitrity, elektronová spinová (paramagnetická) rezonance ESR (EPR) (Komarov et al., 1993) nebo fluorescenční detekce NO pomocí diaminů (DAF, DAN), které v přítomnosti kyslíku reagují s NO za vzniku triazolů (Kojima et al., 1998).

3.2.7 Vliv NO na oplození

Motilita spermií

První studie o NO a motilitě spermií analyzovaly efekt a vliv sloučenin uvolňujících NO na pohyb spermií a jejich životaschopnost. Například Hellstrom (1994) prokázal výhody nízké koncentrace sloučenin uvolňujících NO. SNP (nitroprusid sodný) měl pozitivní vliv na udržení motility a vitality u lidských spermií po rozmražení. Herrero (1994) předpokládá, že NO se může také chovat jako stimulant hyperaktivace u myších spermií. Navíc bylo demonstrováno zlepšení motility spermií u křečků při nízkých koncentracích SNP (Creech et al., 1998). V několika studiích byl pozorován pokles motility spermií při odlišných koncentracích SNP. Inhibice motility byla pozorována při použití vysoké koncentrace sloučenin uvolňujících NO (Herrero et al., 1994, Roselli et al., 1995, Weinberg et al., 1995). Předpokládá se, že snížení koncentrace endogenního NO ve spermii může negativně ovlivňovat motilitu a tím i proces oplození (Lewis et al., 1996), jelikož bylo pozorováno, že po přidání NOS inhibitoru L-NAME do inkubačního média dochází ke snížení motility spermií u lidí a křečků (Donnelly et al., 1997).

Kapacitace

První důkazy o účasti NO v procesu kapacitace byly pozorovány u lidských spermií, které byly inkubovány společně s nízkou koncentrací sloučenin uvolňujících NO a kdy následně došlo ke zvýšení počtu spermií, které prodělali kapacitaci (Zini et al., 1995). Navíc přítomnost těchto sloučenin urychluje proces kapacitace a tím i schopnost podstoupit akrozomální reakci (Herrero et al., 1999). Přidání inhibitorů NOS na začátku inkubace mělo za následek významný pokles kapacitačních procesů, což indikuje, že endogenní NO je nezbytný pro spermie v rámci oplozovacích schopností (Herrero et al., 1999).

Akrozomální reakce

Bylo pozorováno, že u spermií člověka vyvolávaly donory NO akrozomální reakci v závislosti na jejich koncentraci. Zatímco hemoglobin zabraňoval v aktivaci AR v kapacitovaných spermích (Revelli et al., 1999). Podobně u spermií myši, přidání dvou NOS inhibitorů (L-NAME, Nitro arginin) mělo za následek kompletní blokaci schopnosti progesteronu stimulovat akrozomální exocytózu, zatímco donor NO spermine NONOate přímo vyvolal efekt akrozomální exocytózy (Herrero et al., 1999). Byl pozorován škodlivý vliv vysokých koncentrací NO na buněčné funkce. SNONOate v dávce 100 μ l spouštěl akrozomální reakci u 45 % myších spermií, při dávce 1000 μ l sNONOate navození akrozomální reakce selhávalo (Herrero et al., 1999).

NO je tedy spojován s většinou procesů vedoucích k oplození (Herrero a Gagnon, 2001).

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Odběr a zpracování spermií

V experimentech byly použity komerční dávky spermatu od kanců (věk: $2,7 \pm 1,1$ let, průměr \pm SD, $n = 11$) různých plemen (např. Pietrain, Duroc, Česká landrasa, Přestické černostrakaté), které byly pořízeny v chovné stanici CHOVSERVIS (Hradec Králové, Česká republika). Kanci byli krmeni standartní směsí obilovin a bílkovin ve formě suchých kompletních krmných směsí nebo tekutých krmiv.

Frakce ejakulátu, bohaté na spermie byly shromažďovány 1x týdně pomocí metody odběru „do ruky“. Po odběru byly ejakuláty naředěny ředidlem Solusem® (pH ≈ 7 , osmolalita ≈ 300 mOsm / kg, AIM Worldwide, Vught, Nizozemsko) a transportovány do laboratoře při teplotě 17°C. U vzorků byla vyhodnocena motilita a podíl abnormálních spermií. Pro další experimenty byly použity pouze vzorky, které měli minimálně 75 % motilitu a maximálně 25% podíl abnormálních spermií. Aby se snížil efekt variability mezi jednotlivými kanci, byly odebrané ejakuláty od různých kanců smíchány do jednoho směsného vzorku. Poté byla provedena kontrola koncentrace spermií pomocí Bürkerovy komůrky a vzorky byly dále ředěny Solusem® tak, aby bylo dosaženo konečné koncentrace 20×10^6 spermií/ml.

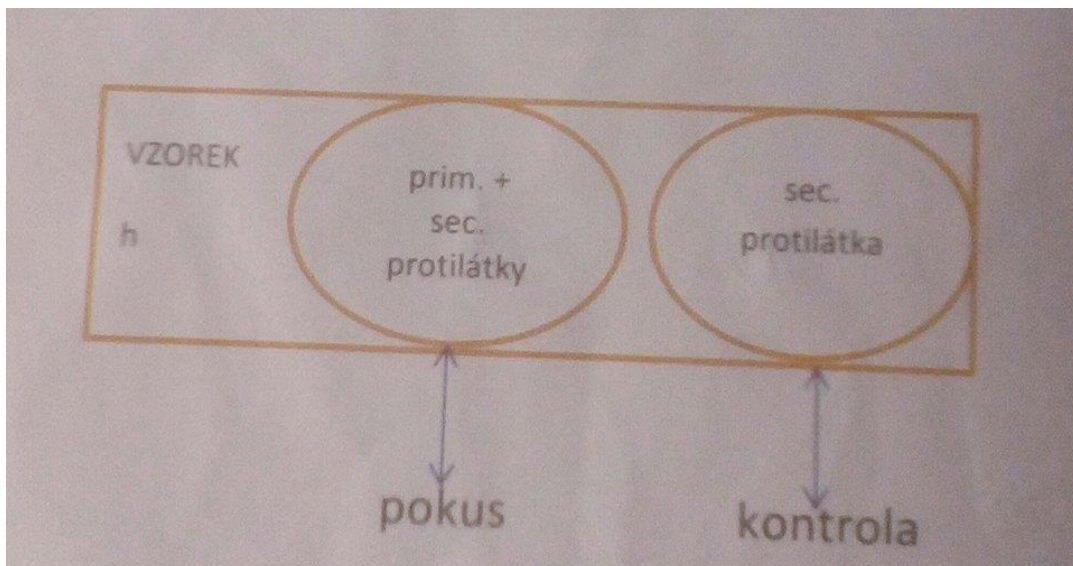
Vzorky spermií pro stanovení izoform NOS byly ředěny Solusem® na konečnou koncentraci 30×10^6 . Koncentrace byla stanovena pomocí Bürkerovy komůrky. Preparáty byly připravovány následujícím způsobem. Pomocí voskové fixy (PAP PEN) byla ohraničena plocha pro suspenzi spermií, jedna pro vlastní stanovení, druhá jako kontrolní pro ověření specifity vazby protilátky (obrázek 3). Do každé ohraničené plochy na sklíčkách bylo nanášeno 20 μ l vzorku spermií. Spermie byly fixovány 50 μ l vymraženého aceton-methanolu (1:1), které byly přidány k vzorkům na sklíčkách. Spermie byly fixovány po dobu 10 minut. Takto připravené preparáty byly usušeny a uskladněny do dalších experimentů ve 4°C.

4.2 Metodika

4.2.1 Stanovení izoform NOS

Izoformy NOS byly ve vzorcích kančích spermií stanoveny pomocí imunolokalizace. Vzorky byly po fixaci opláchnuty roztokem PBS stříčkou a blokovány blokačním roztokem SuperBlock™ (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA USA) po dobu 30 minut. Po oplachu PBS byly spermie inkubovány se 75μl primární protilátky. Jako primární protilátky byly použity králičí anti-eNOS Ig, anti-nNOS Ig a anti n-NOS Ig (Bioss, Chicago, IL, USA). Kontrola byla inkubována pouze s PBS. Inkubace probíhala přes noc ve vlhké komůrce při teplotě 4°C. Poté byly vzorky opláchnuty (PBS) a inkubovány se sekundární protilátkou (50μl). Jako sekundární protilátka byl použit anti-rabbit Ig konjugovaný s fluorescein isothiocyanatem (FITC; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Vzorky byly inkubovány dobu 1 h ve vlhké komůrce. Preparáty byly poté opláchnuty PBS a následně destilovanou H₂O. DNA byla obarvena 4',6-diamidin-2-fenylindolem (DAPI), který byl součástí montovacího média (Vectashieldu s DAPI). Přítomnost izoform NOS byla vyhodnocena na konfokálním mikroskopu Zeiss (Carl Zeiss, Německo).

Izoformy NOS byly stanoveny v ejakulovaných a kapacitovaných spermích.



Obrázek 3: Schéma přípravy vzorků kančích spermií pro imunolokalizaci

4.2.2 Vliv inhibice NOS na motilitu kančích spermíí

Pro stanovení vlivu inhibice NOS byly použity N ω -nitro-L-arginin hydrochlorid methylestere (L-NAME) a aminoguanidin (AG).

Příprava roztoků inhibitorů NOS

Zásobní roztoky L-NAME a AG byly připraveny zředěním chemikálií ve fyziologickém roztoku (0,9% NaCl) v koncentracích 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 mM. Zásobní roztoky byly až do použití skladovány při teplotě -20 °C.

Zásobní roztoky byly do vzorků spermíí přidány v poměru 1:10, aby výsledné koncentrace inhibitorů NOS (L-NAME i AG) ve vzorcích byly 0,625; 1,25; 2,5; 5 a 10 mM. Pro kontrolní vzorky byl použit stejný objem fyziologického roztoku. Všechny vzorky spermíí byly skladovány při teplotě 17 °C. Motilita spermíí byla analyzována po 0 (pouze kontrola), 4, 24, 48 a 72 hodinách inkubace při 38 °C po dobu 15 minut.

4.2.3 Vliv donoru NO na motilitu kančích spermíí

Pro stanovení vlivu donoru NO byl použit nitroprusid sodný (SNP)

Příprava roztoku donoru NO

Zásobní roztoky SNP byly připraveny zředěním sloučeniny ve fyziologickém roztoku (0,9% NaCl) v koncentracích 187,5; 375; 750 a 1500 μ M. Zásobní roztoky byly až do použití skladovány při teplotě -20 °C.

Zásobní roztoky byly do vzorků spermíí přidány v poměru 1:10 tak, aby konečné koncentrace SNP ve vzorcích byly 18,75; 37,5; 75 a 150 μ M. Pro kontrolní vzorky byl použit stejný objem fyziologického roztoku. Všechny vzorky spermíí byly skladovány při teplotě 17 °C. Motilita spermíí byla analyzována po 0 (pouze kontrola), 4, 24, 48 a 72 hodinách inkubace při 38 °C po dobu 15 minut.

4.2.4 Kapacitace kančích spermíí

Suspenze spermíí byla dvakrát promyta v roztoku TBS a centrifugována při 1000 otáčkách za minutu (200 g) po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl supernatant odsát pipetou. Promyté spermie byly následně resuspendovány TBM (2-4 ml) a poté navrstveny po kapkách na Percoll gradient. Tento sloupcový gradient byl centrifugován při 1000 otáčkách za minutu (200 g) po dobu 1 h. Sediment spermíí z 80% Percollu byl znovu dvakrát promyt v TBM pomocí centrifugace při 1000 otáčkách za minutu (200 g) po dobu 10 minut. Po druhém promytí a resuspendaci v roztoku TBM+BSA (1 mg/ml) byly vzorky naředěny na koncentraci $2,5-5 \times 10^7$ spermíí/ml. Inkubace spermíí pro navození kapacitace v kapacitačním médiu trvala 4 h při teplotě 37 °C s 5% CO₂.

4.2.5 Hodnocení motility spermíí

Do předehřáté (38 °C) Maklerovy komůrky (Sefi-Medical instruments, Haifa, Izrael, hloubka komory 10 μm) byl vložen vzorek se spermii (5 μl). Motilita spermíí byla hodnocena subjektivně odhadnutím procenta pohyblivých spermíí (min. 5%) a kvalita pohybu (QM) pomocí stupnice od 0 (nejnižší: bez motility) do 5 (nejvyšší: progresivní a energické pohyby). Index motility spermíí (SMI) byl vypočítán pomocí vzorce: $[\% \text{ individuální motility} + (\text{QM} \times 20)] / 2$ (Comizzoli et al., 2001). Kinetika spermíí byla hodnocena pomocí počítačové analýzy spermíí (CASA, computer assisted semen analysis; NIS-Elements, Nikon, Tokyo, Japan a Laboratory Imaging, Praha, Česká republika), která využívá mikroskop Eclipse E600 s fázovým kontrastem (Nikon, Tokyo, Japonsko), vybavený objektivem s negativním fázovým kontrastem (Nikon, Tokio, Japonsko), ohřevnou deskou nastavenou na 38 °C (Tokai Hit, Shizuoka, Japonsko) a digitální kamerou DMK 23UM021 (The Imaging Source, Bremen, Německo). Zaznamenávány byly celkem čtyři parametry kinetiky spermíí v šesti náhodných polích s minimálně 200 spermii na vzorek: průměrná rychlost pohybu (VAP, average path velocity, μm/s), průměrná rychlost na skutečné dráze (VCL, curvilinear velocity, μm/s), lineární rychlost (VSL, straight-line velocity μm/s), amplituda oscilace hlavičky (ALH, amplitude of lateral head displacement, μm). Standartní nastavení bylo následující: snímky za sekundu: 60; minimální počet pořízených snímků: 21; $VAP \geq 10 \mu\text{m/s}$ pro klasifikaci spermie jako pohyblivé.

4.2.6 Statistické vyhodnocení

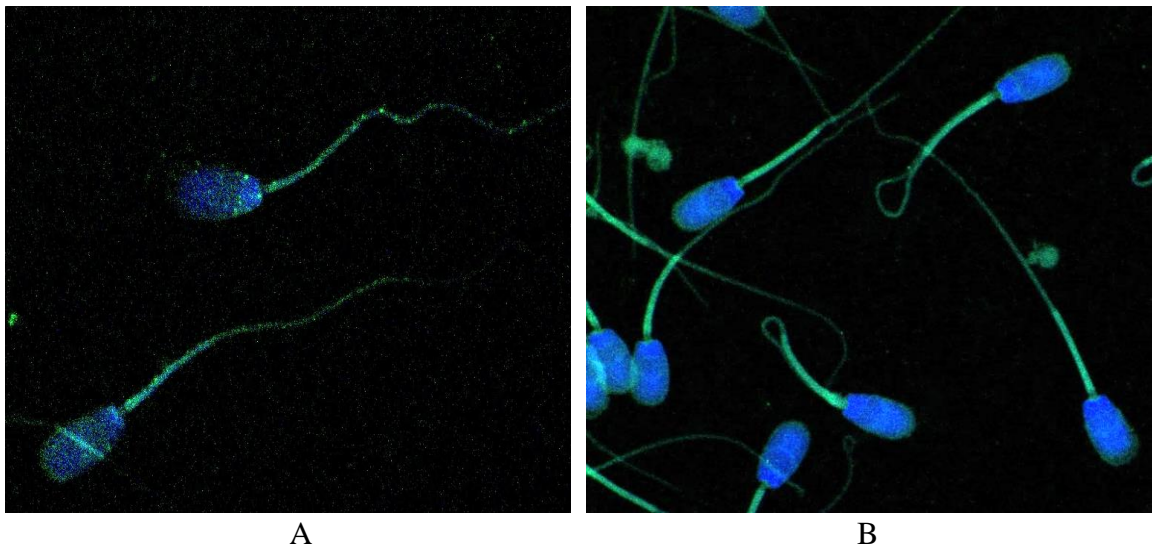
Experimenty byly opakovány 5krát. Získaná data byla podrobena statistické analýze pomocí statistického softwaru SPSS 20.0 (IBM Inc, Chicago, IL, USA). Použit byl generalizovaný lineární model (GZLM) pro analýzu účinků roztoků a doby skladování na proměnné spermií. Uvedená data jsou zobrazena jako průměr \pm SD. Hladina statistické významnosti byla stanovena na $p < 0,05$.

5 Výsledky

5.1 Stanovení izoformem NOS

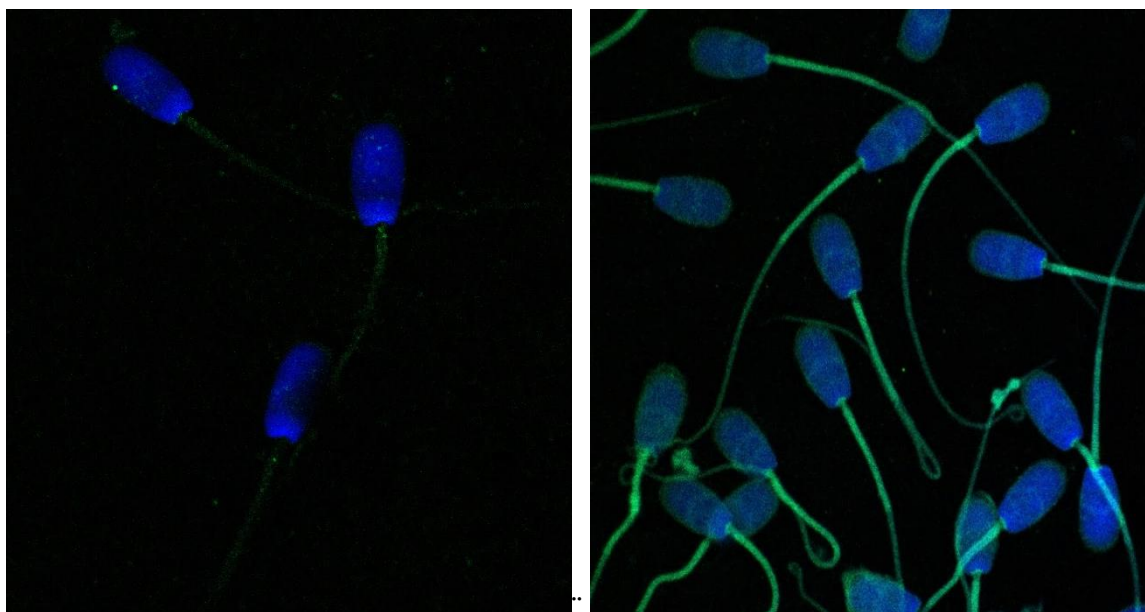
V kančích spermích byly zjištěny všechny tři izoformy NOS (obr. 4-5). Signál byl zaznamenán zejména na krčku a bičíku spermie. Isoforma eNOS byla lokalizována také v oblasti akrozomu. Výrazně silnější signál byl zjištěn k spermii kapacitovaných ve srovnání s ejakulovanými spermii.

Obrázek 4: Isoforma eNOS v kančích spermích ejakulovaných (A) a kapacitovaných (B).



eNOS je barvena zeleně (FITC), chromatin je barven modře (DAPI). Zvětšení 630x.

Obrázek 5: Izoforma iNOS v kančích spermích ejakulovaných (A) a kapacitovaných (B).

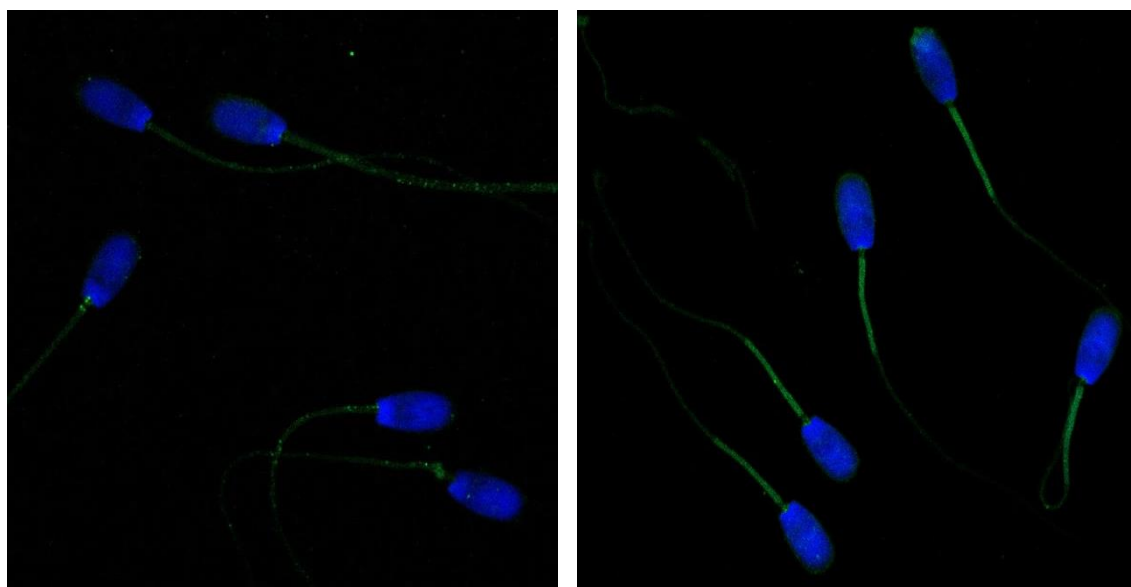


A

B

iNOS je barvena zeleně (FITC), chromatin je barven modře (DAPI). Zvětšení 630x.

Obrázek 6: Izoforma nNOS v kančích spermích ejakulovaných (A) a kapacitovaných (B).



A

B

nNOS je barvena zeleně (FITC), chromatin je barven modře (DAPI). Zvětšení 630x.

5.2 Vliv NO na motilitu kančích spermií

5.2.1 Vliv inhibice NOS na motilitu kančích spermií

Inhibice NOS inhibitorem AG významně zlepšila SMI ve všech experimentálních skupinách ($p < 0,05$) po 48 a 72 hodinách inkubace kromě skupin, které byly ošetřeny nejnižší (0,625 mM) a nejvyšší (10 mM) koncentrací inhibitoru ($p > 0,05$; Tabulka 1). U parametrů kinetiky spermií bylo zjištěno, že po 72 hodinách inkubace došlo u skupiny inkubované v přítomnosti 0,625 mM AG ke zvýšení ALH, VCL a VSL ($p < 0,001$, $p = 0,042$, a $p = 0,036$, Tabulka 1). Na druhou stranu, inkubace spermií v přítomnosti 10 mM AG došlo k významnému snížení hodnot všech kinetických parametrů ($p < 0,05$).

Inhibice NOS inhibitorem L-NAME v koncentraci 0,625 mM neměla žádný vliv na motilitu a kinetiku spermií. Negativní efekt měl inkubace v přítomnosti inhibitoru na ALH a VCL byl zjištěn u vzorků, které byly inkubovány s L-NAME v koncentracích 5 a 10 mM během celé doby inkubace ($p < 0,05$; Tabulka 2). Po 72 hodinách inkubace s L-NAME v koncentraci 5 a 10 mM nebyla kinetika spermií vyhodnocena, protože bylo ve vzorcích byla zjištěno méně než 5% pohyblivých spermií.

5.2.2 Vliv donoru NO na motilitu kančích spermií

Donor NO SNP neměl na motilitu kančích spermií ve sledovaných koncentracích (18,75 - 150 μM) buď žádný vliv, anebo byl naopak pozorován negativní efekt donoru (Tabulka 3). V případě SMI neměl SNP při nejnižší koncentraci (18,75 μM) žádný statisticky významný efekt během celé doby inkubace ($p > 0,05$). Naopak nejvyšší hodnocená koncentrace (150 μM) donoru NO významně snížila SMI během 48 a 72 hodinách inkubace ($p = 0,001$ a $p < 0,001$). Výrazné zvýšení SMI bylo pozorováno pouze u vzorků po 24 h skladování, které byly ošetřeny koncentrací 37,5 μM SNP ($p = 0,021$). Při hodnocení kinetiky spermií bylo zjištěno, že inkubace s donorem NO statisticky významně snížila ALH během čtyř hodin inkubace spermií při použití koncentrace SNP 18,75, 75,0, a 150,0 μM ($p = 0,026$, $p = 0,043$ a $p = 0,026$). Další snížení hodnoty tohoto parametru bylo pozorováno u skupin, které byly inkubovány s koncentrací SNP 37,5, 75,0 a 150,0 μM ($p = 0,006$, $p = 0,001$, and $p = 0,002$). Kromě toho inkubace spermií s SNP vedla k výraznému výrazně snížení VCL u všech sledovaných koncentrací po celou dobu inkubace ($p > 0,05$), ačkoliv nebyl pozorován statisticky významný rozdíl u pokusné skupiny inkubované po dobu 72 h, která byla vystavena působení donoru v koncentraci 18,75 μM ($p > 0,05$).

Tabulka 1: Vliv inhibitoru AG na motilitu kančích spermií během inkubace v 17 °C

Parametr	Ošetření	Čas				
		0h	4h	24h	48h	72h
SMI (%)	Kontr.	63.00 ± 4.47	62.00 ± 4.47	58.00 ± 4.47	53.50 ± 2.24	49.00 ± 2.24
	AG 0.625 mM		61.50 ± 4.87	61.00 ± 5.76	59.50 ± 5.42	54.00 ± 8.77
	AG 1.25 mM		63.50 ± 6.02	65.00 ± 10.16	63.50 ± 6.98*	59.50 ± 14.62*
	AG 2.5 mM		67.00 ± 8.37	65.00 ± 5.00	66.50 ± 2.24**	67.00 ± 7.79***
	AG 5 mM		62.00 ± 4.47	65.00 ± 5.00	62.00 ± 6.47*	60.50 ± 9.91**
	AG 10 mM		62.00 ± 4.47	59.50 ± 1.12	57.50 ± 3.95	55.00 ± 9.52
ALH (µm)	Kontr.	2.91 ± 0.19	3.15 ± 0.34	3.12 ± 0.43	2.88 ± 0.14	2.64 ± 0.22
	AG 0.625 mM		3.24 ± 0.27	3.15 ± 0.19	3.17 ± 0.43	3.36 ± 0.62***
	AG 1.25 mM		3.03 ± 0.31	3.25 ± 0.16	3.02 ± 0.44	3.12 ± 0.45*
	AG 2.5 mM		3.03 ± 0.17	2.95 ± 0.32	2.89 ± 0.31	2.76 ± 0.60
	AG 5 mM		3.04 ± 0.24	2.70 ± 0.40*	2.46 ± 0.53*	2.47 ± 0.50
	AG 10 mM		2.76 ± 0.37	2.16 ± 0.23***	2.33 ± 0.38**	2.15 ± 0.57*
VAP (µm/s)	Kontr.	35.17 ± 3.62	37.33 ± 6.04	37.03 ± 6.99	32.90 ± 3.47	30.31 ± 3.70
	AG 0.625 mM		33.30 ± 4.42	32.21 ± 2.52	32.51 ± 4.38	33.20 ± 4.78
	AG 1.25 mM		34.35 ± 5.21	32.06 ± 5.88	32.78 ± 4.21	30.28 ± 5.14
	AG 2.5 mM		33.20 ± 5.79	30.90 ± 1.55*	31.68 ± 1.82	28.39 ± 3.34
	AG 5 mM		34.21 ± 2.57	26.75 ± 2.49***	26.62 ± 3.16*	26.53 ± 3.73
	AG 10 mM		28.23 ± 1.31***	22.98 ± 2.46***	23.36 ± 1.67***	20.61 ± 0.76***
VCL (µm/s)	Kontr.	83.00 ± 2.32	89.38 ± 10.44	94.55 ± 12.71	82.37 ± 10.57	75.44 ± 8.73
	AG 0.625 mM		85.06 ± 13.05	85.29 ± 9.35	84.03 ± 13.51	86.33 ± 11.71*
	AG 1.25 mM		88.52 ± 2.77	87.69 ± 3.54	78.61 ± 11.01	71.87 ± 14.07
	AG 2.5 mM		87.95 ± 5.85	79.96 ± 5.65**	73.45 ± 8.84	69.93 ± 19.85
	AG 5 mM		92.83 ± 4.71	66.77 ± 5.96***	64.86 ± 11.20***	63.04 ± 10.74*
	AG 10 mM		80.18 ± 9.48	58.27 ± 7.40***	61.43 ± 9.44***	53.70 ± 11.82***
VSL (µm/s)	Kontr.	25.64 ± 3.84	23.32 ± 1.83	23.43 ± 3.73	21.83 ± 3.07	20.40 ± 1.38
	AG 0.625 mM		24.76 ± 3.42	23.49 ± 4.08	23.17 ± 3.76	25.06 ± 5.93*
	AG 1.25 mM		23.29 ± 4.59	22.24 ± 5.26	24.54 ± 4.81	23.88 ± 4.42
	AG 2.5 mM		21.57 ± 3.17	20.71 ± 1.36	22.96 ± 2.26	20.79 ± 3.32
	AG 5 mM		18.29 ± 2.47*	17.23 ± 2.03**	18.32 ± 1.97	18.94 ± 3.33
	AG 10 mM		14.45 ± 1.05***	14.93 ± 1.52***	14.38 ± 1.66***	14.47 ± 9.21**

Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl mezi pokusnou skupinou a kontrolní skupinou v daném čase (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001). SMI: pohyblivost spermií, index motility spermií; ALH: amplituda oscilace hlavičky, amplitude of lateral head displacement; VAP: průměrná rychlost pohybu, average path velocity; VCL: průměrná rychlost na skutečné dráze, curvilinear velocity; VSL: lineární rychlost, straight-line velocity; Kontr: kontrola; L-NAME: N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride; N/A: nehodnotitelné. Data představují průměr ± směrodatnou odchylku (SD)

Tabulka 2: Vliv inhibitoru L-NAME na motilitu kančích spermií během inkubace v 17 °C

Parametr	Ošetření	Čas					
		0h	4h	24h	48h	72h	
SMI (%)	Kontr.	63.00 ± 4.47	62.00 ± 4.47	58.00 ± 4.47	53.50 ± 2.24	49.00 ± 2.24	
	L-NAME 0.625 mM		63.00 ± 4.47	59.00 ± 2.24	53.00 ± 5.70	52.00 ± 4.47	
	L-NAME 1.25 mM		62.00 ± 4.47	56.00 ± 2.24	47.50 ± 3.95	43.00 ± 5.70	
	L-NAME 2.5 mM		62.00 ± 4.47	52.00 ± 3.26	44.50 ± 5.12*	36.00 ± 4.18**	
	L-NAME 5 mM		59.50 ± 3.71	47.00 ± 2.09**	33.00 ± 6.71***	27.00 ± 6.94***	
	L-NAME 10 mM			52.50 ± 3.54*	39.00 ± 6.75***	23.00 ± 5.70***	19.00 ± 4.18***
ALH (µm)	Kontr.	2.91 ± 0.19	3.15 ± 0.34	3.12 ± 0.43	2.88 ± 0.14	2.64 ± 0.22	
	L-NAME 0.625 mM		3.15 ± 0.21	3.32 ± 0.26	3.26 ± 0.39	2.87 ± 0.24	
	L-NAME 1.25 mM		3.01 ± 0.28	3.01 ± 0.34	2.99 ± 0.48	2.38 ± 0.46	
	L-NAME 2.5 mM		2.93 ± 0.22	2.73 ± 0.44	2.36 ± 0.19**	1.73 ± 0.24	
	L-NAME 5 mM			2.58 ± 0.36**	2.30 ± 0.31***	1.86 ± 0.18***	N/A
	L-NAME 10 mM			2.36 ± 0.35***	2.19 ± 0.34***	1.20 ± 0.53***	N/A
VAP (µm/s)	Kontr.	35.17 ± 3.62	37.33 ± 6.04	37.03 ± 6.99	32.90 ± 3.47	30.31 ± 3.70	
	L-NAME 0.625 mM		38.91 ± 5.82	35.53 ± 5.38	30.50 ± 6.42	30.19 ± 3.71	
	L-NAME 1.25 mM		37.71 ± 6.32	34.07 ± 6.02	31.69 ± 9.19	23.84 ± 1.81*	
	L-NAME 2.5 mM		36.89 ± 3.76	30.69 ± 4.46*	26.27 ± 6.33*	18.33 ± 4.24***	
	L-NAME 5 mM		32.87 ± 5.32	25.69 ± 1.91***	16.79 ± 1.40***	N/A	
	L-NAME 10 mM			28.61 ± 5.37***	19.39 ± 2.20***	14.85 ± 1.41***	N/A
VCL (µm/s)	Kontr.	83.00 ± 2.32	89.38 ± 10.44	94.55 ± 12.71	82.37 ± 10.57	75.44 ± 8.73	
	L-NAME 0.625 mM		94.96 ± 9.64	92.79 ± 10.56	86.09 ± 11.11	82.93 ± 6.51	
	L-NAME 1.25 mM		86.68 ± 6.21	87.47 ± 13.47	83.00 ± 15.71	67.23 ± 6.89	
	L-NAME 2.5 mM		85.63 ± 3.69	81.21 ± 13.00*	69.08 ± 10.88*	52.79 ± 4.01***	
	L-NAME 5 mM		77.59 ± 7.75*	66.08 ± 10.12***	53.27 ± 3.99***	N/A	
	L-NAME 10 mM			65.56 ± 10.96***	59.14 ± 14.9***	38.31 ± 21.23***	N/A
VSL (µm/s)	Kontr.	25.64 ± 3.84	23.32 ± 1.83	23.43 ± 3.73	21.83 ± 3.07	20.40 ± 1.38	
	L-NAME 0.625 mM		25.04 ± 2.37	25.47 ± 3.49	21.63 ± 6.32	22.94 ± 4.62	
	L-NAME 1.25 mM		25.92 ± 3.75	25.79 ± 4.12	24.42 ± 8.44	19.62 ± 2.44	
	L-NAME 2.5 mM		26.09 ± 2.24	24.07 ± 3.47	21.90 ± 6.18	15.94 ± 4.33	
	L-NAME 5 mM		22.84 ± 3.06	21.01 ± 1.25	12.91 ± 3.49***	N/A	
	L-NAME 10 mM		21.16 ± 2.41	15.09 ± 3.62***	13.60 ± 0.03**	N/A	

Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl mezi pokusnou skupinou a kontrolní skupinou v daném čase (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001). SMI:

pohyblivost spermií, index motility spermií; ALH: amplituda oscilace hlavičky, amplitude of lateral head displacement; VAP: průměrná rychlost pohybu, average path velocity; VCL: průměrná rychlost na skutečné dráze, curvilinear velocity; VSL: lineární rychlost, straight-line velocity; Kontr: kontrola; L-NAME: No-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride; N/A: nehodnotitelné. Data představují průměr ± směrodatnou odchylku (SD)

Tabulka 3: Vliv donoru NO SNP na motilitu kančích spermíí během inkubace v 17 °C

Parametr	Ošetření	Čas				
		0h	4h	24h	48h	72h
SMI (%)	Kontr.	63.00 ± 4.47	62.00 ± 4.47	58.00 ± 4.47	53.50 ± 2.24	49.00 ± 2.24
	SNP 18.75 μM		60.50 ± 4.47	58.50 ± 10.55	55.50 ± 6.22	43.50 ± 14.96
	SNP 37.5 μM		62.50 ± 4.33	68.00 ± 3.71*	54.50 ± 10.95	45.50 ± 16.24
	SNP 75 μM		60.50 ± 4.47	59.00 ± 7.83	48.00 ± 11.65	40.00 ± 19.96*
	SNP 150 μM		60.00 ± 6.37	50.50 ± 10.52	39.00 ± 8.94***	31.00 ± 17.82***
ALH (μm)	Kontr.	2.91 ± 0.19	3.15 ± 0.34	3.12 ± 0.43	2.88 ± 0.14	2.64 ± 0.22
	SNP 18.75 μM		2.72 ± 0.12*	2.95 ± 0.52	2.92 ± 0.47	2.74 ± 0.27
	SNP 37.5 μM		2.78 ± 0.21	2.54 ± 0.21**	2.60 ± 0.53	2.58 ± 0.22
	SNP 75 μM		2.76 ± 0.20*	2.46 ± 0.15***	2.57 ± 0.16	2.68 ± 0.21
	SNP 150 μM		2.72 ± 0.14*	2.48 ± 0.71**	2.87 ± 0.53	2.39 ± 0.00
VAP (μm/s)	Kontr.	35.17 ± 3.62	37.33 ± 6.04	37.03 ± 6.99	32.90 ± 3.47	30.31 ± 3.70
	SNP 18.75 μM		32.54 ± 3.47	27.97 ± 6.41***	28.38 ± 4.73	26.13 ± 4.05
	SNP 37.5 μM		30.98 ± 4.53*	28.32 ± 3.98***	25.09 ± 4.17**	29.68 ± 2.86
	SNP 75 μM		32.57 ± 3.26	27.31 ± 5.08***	26.50 ± 2.87*	23.20 ± 5.04**
	SNP 150 μM		29.90 ± 7.70**	25.87 ± 4.47***	24.86 ± 4.10**	30.17 ± 1.48
VCL (μm/s)	Kontr.	83.00 ± 2.32	89.38 ± 10.44	94.55 ± 12.71	82.37 ± 10.57	75.44 ± 8.73
	SNP 18.75 μM		74.45 ± 1.54**	66.67 ± 5.14***	66.17 ± 12.84**	64.46 ± 9.23
	SNP 37.5 μM		68.79 ± 7.39***	62.32 ± 5.40***	55.80 ± 8.93***	59.23 ± 1.96**
	SNP 75 μM		69.14 ± 5.66***	59.47 ± 5.95***	58.53 ± 3.02***	51.38 ± 2.42***
	SNP 150 μM		68.55 ± 9.57***	57.72 ± 1.93***	54.59 ± 7.96***	57.07 ± 3.41**
VSL (μm/s)	Kontr.	25.64 ± 3.84	23.32 ± 1.83	23.43 ± 3.73	21.83 ± 3.07	20.40 ± 1.38
	SNP 18.75 μM		26.29 ± 3.38	22.04 ± 7.08	22.68 ± 6.48	21.12 ± 5.00
	SNP 37.5 μM		25.06 ± 3.74	23.62 ± 4.57	21.30 ± 4.21	26.59 ± 3.16
	SNP 75 μM		26.71 ± 3.99	22.43 ± 5.73	22.51 ± 3.21	18.71 ± 7.03*
	SNP 150 μM		23.61 ± 6.23	21.03 ± 5.08	19.61 ± 5.23	26.55 ± 0.80

Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl mezi pokusnou skupinou a kontrolní skupinou v daném čase (*p<0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001). SMI: pohyblivost spermíí, index motility spermíí; ALH: amplituda oscilace hlavičky, amplitude of lateral head displacement; VAP: průměrná rychlost pohybu, average path velocity; VCL: průměrná rychlost na skutečné dráze, curvilinear velocity; VSL: lineární rychlost, straight-line velocity; Kontr: kontrola; L-NAME: Nω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride; N/A: nehodnotitelné. Data představují průměr ± směrodatnou odchylku (S)

6 Diskuze

Ve kančích spermích byla nalezeny všechny tři izoformy NOS, e-NOS, n-NOS a i-NOS. Přítomnost izoform NOS byla popsána u spermí člověka i myši (Herrero et al., 1996; Lewis et al., 1996). U kančích spermí popsal přítomnost všech tří isoform NOS Aquilla et al. (2011). Lokalizace izoform u kančích spermí však dosud studována nebyla. V našich experimentech byly jednotlivé izoformy lokalizovány zejména v krčku a hlavní části bičíku a také v akrozomu podobně jako bylo popsáno u myších spermí (Herrero et al., 1996). Avšak u spermí člověka byly nNOS a eNOS pozorovány na ekvatoriálním a postakrozomálním segmentu, ale už ne na bičíku (Lewis et al., 1996). Avšak na rozdíl od kančích spermí se u myší množství NOS po kapacitaci snižuje.

Výsledky diplomové práce ukazují, že inhibice selektivními nebo neselektivními inhibitory NOS vykazuje při inkubaci spermí různé účinky na motilitu spermí kanců. Například po 72 h inkubace spermí zvýšil selektivní inhibitor AG v koncentraci 0,625 mM kinetické parametry jako jsou ALH, VCL a VSL, které jsou spojovány s fertilitou kanců (Broekhuijse et al. 2012). Pozitivní účinky AG na motilitu spermí mohou být zprostředkovány antioxidačním účinkem inhibitoru proti volným radikálům jako jsou ROS a RNS (Yildiz et al. 1998). Tímto způsobem Abbasi et al. (2011a, 2011b) a Alizadeh et al. (2010, 2016) ukázaly, že AG zlepšuje parametry spermí (tj. pohyblivost, životaschopnost, morfologie bez abnormalit, membránový potenciál mitochondrií, a integritu DNA) u varikokulizovaných potkanů, kde zvýšená exprese iNOS vede k vysokému oxidativnímu stresu ve spermích. Z tohoto důvodu se lze domnívat, že antioxidační vlastnosti AG mohou chránit spermie kanců proti ROS během skladování spermatu. Naopak negativní účinky vysokých koncentrací AG (10 mM) lze vysvětlit inhibicí aktivity katalázy, což vede ke snížení redukce peroxidu vodíku (H_2O_2) (Ou a Wolf, 1993). Vzhledem k tomu, že obsah katalázy u spermí je nízký (Foote, 1962), následné zvýšení hladiny H_2O_2 může podporovat poškození buněčné membrány peroxidací lipidů, což může mít za následek snížení motility spermí a integritu akrozomu. Přesto je nutné provést další studie za účelem vyhodnocení použití AG a jeho vlivu na parametry spermí kanců během oxidativního stresu.

Zjištění týkající se neselektivního inhibitoru L-NAME jsou celkově v souladu s předchozími studiemi, které ukazují, že L-NAME negativně ovlivňuje motilitu spermií tím, že snižuje procento spermií vykazujících progresivní pohyb, a stejně tak zvýšením počtu nepohyblivých spermií (Rosselli et al. 1995, Hassanpur et al. 2007). U lidských spermií Lewis et al. (1996) zjistili, že L-NAME snižuje VAP, VCL a VSL, které také byly negativně ovlivněny v experimentu této diplomové práce. Díky své neselektivní inhibiční aktivitě vůči izoformám NOS mohou být negativní účinky L-NAME důsledkem extrémně nízkých hodnot NO. V případě bez kapacitačního prostředí, jak bylo v našem experimentu, je kančími spermiemi produkována nízká konstantní hladina NO, která je důležitá pro funkci spermií (Awda et al. 2009). U člověka NO stimuluje například motilitu spermií prostřednictvím aktivace dráhy rozpustné guanylátcyklázy/cyklického guanosinmonofosfátu (sGC/GMP) (Miraglia et al. 2011). Inhibice dráhy sGC/GMP pomocí inhibitorů NOS může představovat další pravděpodobný mechanismus, který je zodpovědný za snížení motility spermií kanců v přítomnosti vysokých koncentrací L-NAME nebo AG. Nicméně v patologických podmínkách jako je varikokela vykazuje L-NAME pozitivní účinky na koncentraci a morfologii spermií, ale už ne na motilitu (Bahmanzadeh et al. 2008).

Podobně jako u nálezů v této diplomové práci, ukázaly předchozí studie, že koncentrace donoru NO SNP v rozmezí od 0.1 do 2,500 μM nemají žádné nebo pouze negativní účinky na motilitu spermií (Rosselli et al. 1995, Weinberg et al. 1995, Rodriguez et al. 2005, Hassanpour et al. 2007, Rahman et al. 2014). Tímto způsobem Balercia et al. (2004) zjistili, že astenoozoospermičtí muži vykazují vyšší hladiny NO než normozoospermičtí. Ve stejné studii autoři také zjistili, že hladiny NO negativně souvisejí s motilitou spermií, VCL a VSL, což podporuje výsledky v této diplomové práci. Na druhou stranu pozitivní účinky SNP na motilitu a životaschopnost spermií byly pozorovány při mnohem nižších koncentracích (tj. 25-100 nM) (Hellstrom et al. 1994, Zhang a Zheng 1996). Negativní účinky SNP mohou souviset s aktivací kaspázy, která podporuje buněčnou apoptózu (Moran et al. 2008). Tímto způsobem Zhang a Zheng (1996) zjistili, že koncentrace SNP vyšší, než 100 nM vykazují škodlivé účinky na životaschopnost spermií u fertálních i infertálních mužů. Kromě tohoto mechanismu, Rahman et al. (2014) v nedávné době zjistili, že SNP snižuje kinetické parametry spermií zvýšením intracelulárních hladin Fe^{2+} a ROS a snížením hladin Ca^{2+} a adenosin trifosfátu (ATP).

7 Závěr

Výsledky experimentů cílených na prokázání izoform NOS a funkce NO/NOS u kančích spermií ukázaly, že izoformy NOS jsou v kančích spermiích přítomné a NO/NOS je zapojen do regulace motility spermií. Nízká koncentrace inhibitoru NOS aminoguanidinu (AG) zlepšuje kinetiku spermií a to může indikovat potenciální využití tohoto selektivního inhibitoru iNOS k zmírnění účinků oxidativního stresu v průběhu uchovávání inseminačních dávek. Vysoké koncentrace selektivních i neselektivních inhibitorů NOS negativně ovlivnily kinetiku spermií, což potvrzuje, že nízká hladina NO je nezbytná pro fyziologické děje v kančích spermiích. Závěrem lze konstatovat, že hypotézy, které byly formulovány byly potvrzeny a experimenty, které jsou součástí diplomové práce přispěly k lepšímu porozumění role NO ve fyziologických procesech kančích spermií.

8 Seznam literatury

Abbasi, M., Alizadeh, R., Abolhassani, F., Amidi, F., Ragerdi, K. I., Fazelpour, Dehpour, A. R. 2011a. Effect of aminoguanidine in sperm DNA fragmentation in varicocele rats: role of nitric oxide. *Reproductive sciences*, 18(6), 545-550.

Abbasi, M., Alizadeh, R., Abolhassani, F., Amidi, F., Hassanzadeh, G., Mehr, S. E., Dehpour, A. R. 2011b. Aminoguanidine improves epididymal sperm parameters in varicocele rats. *Urologia internationalis*. 86(3). 302-306.

Abou-Haila, A., Tulsiani, D. R. 2000. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Archives of biochemistry and biophysics*. 379(2). 173-182.

Abou-haila, A., Tulsiani, D. R. 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of biochemistry and biophysics*. 485(1). 72-81.

Alberts, B. 2017. *Molecular biology of the cell*. Garland science.

Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 357(Pt 3). 593.

Alizadeh, N., Abbasi, M., Abolhassani, F., Amidi, F., Mahmoudi, R., Hoshino, Y., Ragerdikashani, I. 2010. Effects of aminoguanidine on infertile varicocele rats: A functional and morphological study. *DARU: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*. 18(1). 51.

Alizadeh, R., Navid, S., Abbasi, N., Yari, A., Mazaheri, Z., Daneshi, E., Abbasi, M. 2016. The effect of aminoguanidine on sperm motility and mitochondrial membrane potential in varicocele rats. *Iranian journal of basic medical sciences*. 19(12). 1279.

Ambrosino, A., Russo, D., Lamanna, C., Assisi, L., Rizzo, M., Vittoria, A., Cecio, A. 2003. Isoforms of nitric oxide synthase in the pig testis. *Acta Veterinaria Brno*. 72(4). 493-498.

- Aquila, S., Giordano, F., Guido, C., Rago, V., Carpino, A. 2011. Nitric oxide involvement in the acrosome reaction triggered by leptin in pig sperm. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 9(1). 133.
- Austin, C. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Australian journal of biological sciences*. 4(4). 581-596.
- Awda, B. J., Mackenzie-Bell, M., Buhr, M. M. 2009. Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biology of reproduction*. 81(3). 553-561.
- Bahmanzadeh, M., Abolhassani, F., Amidi, F., Sh, E., Salehi, M., Abbasi, M. 2008. The effects of nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) on epididymal sperm count, motility, and morphology in varicocelectomized rat. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 16(1). 23-28.
- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., & Forti, G. (2002). Signal transduction pathways in human spermatozoa. *Journal of reproductive immunology*, 53(1-2), 121-131.
- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Krausz, C., Forti, G. 1996. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci*. 1. d189-205.
- Balercia, G., Moretti, S., Vignini, A., Magagnini, M., Mantero, F., Boscaro, M., Mazzanti, L. 2004. Role of nitric oxide concentrations on human sperm motility. *Journal of Andrology*. 25(2). 245-249.
- Barros, C., Jedlicki, A., Fuenzalida, I., Herrera, E., Arguello, B., Vigil, P., Leontic, E. 1988. Human sperm-cervical mucus interaction and the ability of spermatozoa to fuse with zona-free hamster oocytes. *Journal of reproduction and fertility*. 82(2). 477-484.
- Belleannée, C., Thimon, V., Sullivan, R. 2012. Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell and tissue research*. 349(3). 717-731.
- Benoff, S. 1998. Modelling human sperm-egg interactions in vitro: signal transduction pathways regulating the acrosome reaction. *Molecular human reproduction*. 4(5). 453-471.

- Bredt D. S., Hwang P. M., Snyder S. H. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 25. 347(6295). 768-70.
- Bredt, D. S., Snyder, S. H. 1989. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86(22). 9030-9033.
- Broekhuijse, M. L. W. J., Šoštarić, E., Feitsma, H., Gadella, B. M. 2012. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *Journal of animal science*. 90(3). 779-789.
- Bu S., Xia G., Tao Y., Lei L., Zhou B. 2003. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 207. 21–30.
- Clementi E., Brown G. C., Feelisch M., Moncada S. 1998. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95. 7631–7636
- CREECH, M. M., ARNOLD, E. V., BOYLE, B., MUZENICH, M. C., MONTVELLE, C., BOHLE, D. S., ATHERTON, R. W. 1998. Sperm motility enhancement by nitric oxide produced by the oocytes of fathead minnows, *Pimephelas promelas*. *Journal of andrology*. 19(6). 667-674.
- Dacheux, J. L., Gatti, J. L., Dacheux, F. 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscopy research and technique*. 61(1). 7-17.
- De Jonge, C. 2005. Biological basis for human capacitation. *Human Reproduction Update*. 11(3). 205-214.
- De Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., Wreford, N. 1998. Spermatogenesis. *Human reproduction*. 13(suppl_1). 1-8.

Dixit, V. D., Parvizi, N. 2001. Nitric oxide and the control of reproduction. *Animal reproduction science*. 65(1-2). 1-16.

Donnelly, E. T., Lewis, S. E., Thompson, W., Chakravarthy, U. 1997. Sperm nitric oxide and motility: the effects of nitric oxide synthase stimulation and inhibition. *Molecular human reproduction*. 3(9). 755-762.

Eu, J. P., Sun, J., Xu, L., Stamler, J. S., Meissner, G. 2000. The skeletal muscle calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions. *Cell*. 102(4). 499-509.

Fiedler, S. E., Dudiki, T., Vijayaraghavan, S., Carr, D. W. 2013. Loss of R2D2 proteins ROPN1 and ROPN1L causes defects in murine sperm motility, phosphorylation, and fibrous sheath integrity. *Biology of reproduction*. 88(2). 41-1.

Florman, H. M., Jungnickel, M. K., Sutton, K. A. 2004. Regulating the acrosome reaction. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), 503-510.

Foote, R. H. 1962. Catalase content of rabbit, ram, bull and boar semen. *Journal of Animal Science*. 21(4). 966-968.

Fraser, L. R., Adeoya-Osiguwa, S. A., Baxendale, R. W., Gibbons, R. 2006. Regulation of mammalian sperm capacitation by endogenous molecules. *Front Biosci*. 11. 1636-1645.

Furchgott, R. F., Zawadzki, J. V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288(5789), 373.

Frenette, G., Sullivan, R. 2001. Prostate-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Molecular reproduction and development*. 59(1). 115-121.

Garthwaite, J. 1991. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends in neurosciences*. 14(2). 60-67.

- Gatti, J. L., Castella, S., Dacheux, F., Ecroyd, H., Metayer, S., Thimon, V., Dacheux, J. L. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal reproduction science*. 82. 321-339.
- Groves, J. T., Wang, C. C. 2000. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Current opinion in chemical biology*. 4(6). 687-695.
- Harrison, R. A., Gadella, B. M. 2005. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology*. 63(2). 342-351.
- Harper, C. V., Barratt, C. L., Publicover, S. J. 2004. Stimulation of Human Spermatozoa with Progesterone Gradients to Simulate Approach to the Oocyte INDUCTION OF [Ca²⁺] i OSCILLATIONS AND CYCLICAL TRANSITIONS IN FLAGELLAR BEATING. *Journal of Biological Chemistry*. 279(44). 46315-46325.
- Hassanpour, H., Mirshokrai, P., Shirazi, A., Aminian, A. 2007. Effect of nitric oxide on ram sperm motility in vitro. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*. 10(14). 2374-2378.
- HATTORI, M. A., Tabata, S. 2006. Nitric oxide and ovarian function. *Animal Science Journal*. 77(3). 275-284.
- Hellstrom, W. J., Bell, M., Wang, R., Sikka, S. C. 1994. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability, and lipid peroxidation. *Fertility and sterility*. 61(6). 1117-1122.
- Hermo, L., Pelletier, R., Cyr, D. G., Smith, C. E. 2010. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 3: developmental changes in spermatid flagellum and cytoplasmic droplet and interaction of sperm with the zona pellucida and egg plasma membrane. *Microscopy research and technique*. 73(4). 320-363.
- Herrero, M. B., Cebal, E., Boquet, M., Viggiano, J. M., Vitullo, A., Gimeno, M. A. 1994. Effect of nitric oxide on mouse sperm hyperactivation. *Acta physiologica, pharmacologica et therapeutica latinoamericana: organo de la Asociacion Latinoamericana de Ciencias Fisiologicas y [de] la Asociacion Latinoamericana de Farmacologia*. 44(3). 65-69.

Herrero, M. B., Gagnon, C. 2001. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *Journal of Andrology*. 22(3). 349-356.

Herrero, M. B., de Lamirande, E., Gagnon, C. 1999. Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro. *Biology of reproduction*. 61(3). 575-581.

Herrero, M. B., Viggiano, J. M., Perez, M. S., Gimeno, M. F. 1996. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on the outcome of in vitro fertilization in the mouse. *Reproduction, fertility and development*. 8(2). 301-304.

Huang, T. T. F., Fleming, A. D., Yanagimachi, R. 1981. Only acrosome-reacted spermatozoa can bind to and penetrate zona pellucida: A study using the guinea pig. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 217(2). 287-290.

Hunter, R. H. F. 1996. Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilisation to avoid polyspermy. *Molecular reproduction and development*. 44(3). 417-422.

Hunter, R. H. F., Cook, B., Poyser, N. L. 1983. Regulation of oviduct function in pigs by local transfer of ovarian steroids and prostaglandins: a mechanism to influence sperm transport. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 14(4). 225-232.

Chang, M. C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*. 168(4277). 697.

Chrétien, F. C. 1977. Cervical mucus. III. Physiological roles. *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction*. 6(4). 451-488.

Jablonka-Shariff, A., Olson, L. M. 1997. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology*. 138(1). 460-468.

Janssens S. P., Shimouchi A., Quertermous T., Bloch D. B., Bloch K. D. 1992. Journal of Biological Chemistry. 267. 14519–14522.

Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S. A., Hirohashi, N. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. Proceedings of the National Academy of Sciences. 108(12). 4892-4896.

Kierszenbaum, A. L., Rivkin, E., Tres, L. L. 2011. Cytoskeletal track selection during cargo transport in spermatids is relevant to male fertility. Spermatogenesis. 1(3). 221-230.

Kim, S., Shin, T. 2007. Immunohistochemical study of osteopontin in boar testis. Journal of veterinary science. 8(2). 107-110.

Komarov, A., Mattson, D., Jones, M. M., Singh, P. K., Lai, C. S. 1993. In vivo spin trapping of nitric oxide in mice. Biochemical and biophysical research communications. 195(3). 1191-1198.

Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Nagano, T. 1998. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. Analytical chemistry. 70(13). 2446-2453.

Kunz, G., Beil, D., Deininger, H., Wildt, L., Leyendecker, G. 1996. The dynamics of rapid sperm transport through the female genital tract: evidence from vaginal sonography of uterine peristalsis and hysterosalpingoscintigraphy. Human Reproduction. 11(3). 627-632.

KUPKOVA, Z., BENES, L. 2004. Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. Chemické listy. 98(3). 116-122.

Lamirande, E., Leclerc, P., Gagnon, C. 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. Molecular human reproduction. 3(3). 175-194.

Lewis, S. E. M., Donnelly, E. T., Sterling, E. S. L., Kennedy, M. S., Thompson, W., Chakravarthy, U. 1996. Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Molecular Human Reproduction*. 2. 873-878.

Marquez, B., Suarez, S. S. 2004. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biology of reproduction*. 70(6). 1626-1633.

Meiser, H., & Schulz, R. (2003). Detection and localization of two constitutive NOS isoforms in bull spermatozoa. *Anatomia, histologia, embryologia*, 32(6), 321-325.

Miraglia, E., De Angelis, F., Gazzano, E., Hassanpour, H., Bertagna, A., Aldieri, E., Ghigo, D. 2011. Nitric oxide stimulates human sperm motility via activation of the cyclic GMP/protein kinase G signaling pathway. *Reproduction*. 141(1). 47-54.

Myles, D. G., Hyatt, H., Primakoff, P. 1987. Binding of both acrosome-intact and acrosome-reacted guinea pig sperm to the zona pellucida during in vitro fertilization. *Developmental biology*. 121(2). 559-567.

Nathan, C., Xie, Q. W. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 269(19), 13725-13728.

Ou, P., Wolff, S. P. 1993. Aminoguanidine: a drug proposed for prophylaxis in diabetes inhibits catalase and generates hydrogen peroxide in vitro. *Biochemical pharmacology*. 46(7). 1139-1144.

Osman, R. A., Andria, M. L., Jones, A. D., Meizel, S. 1989. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochemical and biophysical research communications*. 160(2). 828-833.

Petr J., Rajmon R., Rozinek J., Sedmíková M., Jeřeta M., Chmelíková E., Švestková D., Jílek F. 2005. Activation of pig oocytes using nitric oxide donors. *Molecular Reproduction and Development*. 71(1). 115-122.

- Pěkníková, J., Kubátová, A., Sulimenko, V., Dráberová, E., Viklický, V., Hozák, P., & Dráber, P. (2001). Differential subcellular distribution of tubulin epitopes in boar spermatozoa: recognition of class III β -tubulin epitope in sperm tail. *Biology of reproduction*, 65(3), 672-679.
- Rahman, M. S., Kwon, W. S., Lee, J. S., Kim, J., Yoon, S. J., Park, Y. J., Pang, M. G. 2014. Sodium nitroprusside suppresses male fertility in vitro. *Andrology*. 2(6). 899-909.
- Revelli, A., Soldati, G., Costamagna, C., Pellerey, O., Aldieri, E., Massobrio, M., Ghigo, D. 1999. Follicular fluid proteins stimulate nitric oxide (NO) synthesis in human sperm: a possible role for NO in acrosomal reaction. *Journal of cellular physiology*. 178(1). 85-92.
- Rodriguez, P. C., O'flaherty, C. M., Beconi, M. T., Beorlegui, N. B. 2005. Nitric oxide induces acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia*. 37(5). 166-172.
- Romero-Aguirregomezcorta, J., Santa, Á. P., García-Vázquez, F. A., Coy, P., Matás, C. 2014. Nitric Oxide Synthase (NOS) inhibition during porcine in vitro maturation modifies oocyte protein S-nitrosylation and in vitro fertilization. *PloS one*. 9(12). e115044.
- Rosselli, M., Dubey, R. K., Imthurn, B., Macas, E., Keller, P. J. 1995. Andrology: Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Human Reproduction*. 10(7). 1786-1790.
- Sassone-Corsi, P. 2002. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science*, 296(5576). 2176-2178.
- Saxena, D. K., Oh-Oka, T., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Toshimori, K. 2002. Behaviour of a sperm surface transmembrane glycoprotein basigin during epididymal maturation and its role in fertilization in mice. *Reproduction*. 123(3). 435-444.
- Serrano, H., Garcia-Suarez, D. 2001. Molecular aspects of mammalian fertilization. *Asian journal of andrology*. 3(4). 243-250.
- Smith, T., Koyanagi, F., Yanagimachi, R. 1987. Distribution and number of spermatozoa in the oviduct of the golden hamster after natural mating and artificial insemination. *Biology of reproduction*. 37(1). 225-234.

- Sperry, A. O. 2012. The dynamic cytoskeleton of the developing male germ cell. *Biology of the Cell*. 104(5). 297-305.
- Stamler, J. S. 1994. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*. 78(6). 931-936.
- Stauss, C. R., Votta, T. J., Suarez, S. S. 1995. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biology of reproduction*. 53(6). 1280-1285.
- Stuehr, D. J. 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1411(2-3). 217-230.
- Suarez, S. S., Pacey, A. A. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human reproduction update*. 12(1). 23-37.
- Sutovsky, P., Moreno, R., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Thompson, W. E., Schatten, G. 2001. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *Journal of cell science*. 114(9). 1665-1675.
- Talevi, R., Gualtieri, R. 2010. Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology*. 73(6). 796-801.
- Teves, M. E., Guidobaldi, H. A., Uñates, D. R., Sanchez, R., Miska, W., Publicover, S. J., Giojalas, L. C. 2009. Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PloS one*. 4(12). e8211.
- Toshimori, K., & Ito, C. 2003. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Archives of histology and cytology*. 66(5). 383-396.
- Töpfer-Petersen, E., Wagner, A., Friedrich, J., Petrunkina, A., Ekhlasi-Hundrieser, M., Waberski, D., Drommer, W. 2002. Function of the mammalian oviductal sperm reservoir. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 292(2). 210-215.

- Visconti, P. E., Kopf, G. S. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology of reproduction*. 59(1). 1-6.
- Wang R. 2004. *Signal Transduction and the Gasotransmitters: NO, CO and H₂S in Biology and Medicine*. Humana Press, New Jersey, USA, 400 stran.
- Weinberg, J. B., Doty, E., Bonaventura, J., Haney, A. F. 1995. Nitric oxide inhibition of human sperm motility. *Fertility and sterility*. 64(2). 408-413.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. *The physiology of reproduction*.1. 189-317.
- Yanagimachi, R., Chang, M. C. 1963. Sperm ascent through the oviduct of the hamster and rabbit in relation to the time of ovulation. *Journal of reproduction and fertility*. 6(3). 413-420.
- Yanagimachi, R., Mahi, C. A. 1976. The sperm acrosome reaction and fertilization in the guinea-pig: a study in vivo. *Journal of reproduction and fertility*. 46(1). 49-54.
- Yildiz, G., Demiryürek, A. T., Sahin-Erdemli, I., Kanzik, I. 1998. Comparison of antioxidant activities of aminoguanidine, methylguanidine and guanidine by luminol-enhanced chemiluminescence. *British journal of pharmacology*. 124(5). 905-910.
- Zini, A., Lamirande, E., Gagnon, C. 1995. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. *Journal of Andrology*. 16(5). 424-431.
- Zhang, H., Martin-Deleon, P. A. 2003. Mouse Epididymal Spam1 (PH-20) Is Released in the Luminal Fluid With its Lipid Anchor. *Journal of andrology*. 24(1). 51-58.
- Zhang, H., Zheng, R. L. 1996. Possible role of nitric oxide on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm functions. *Free radical research*. 25(4). 347-354.