

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Sulfan produkující enzymy v kančích spermích

Bakalářská práce

Aneta Pilsová

Zoorehabilitace a asistenční aktivity se zvířaty

prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková, Ph. D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Sulfan produkující enzymy v kančích spermiích vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne

Poděkování

Chtěla bych touto cestou poděkovat především prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph. D. za pomoc a odborné rady při zpracovávání teoretické i experimentální části bakalářské práce. Práce byla zpracována v rámci závěrečných prací zaměřených na sulfan produkující enzymy v kančích spermích na Katedře veterinárních disciplín na České zemědělské universitě. Proto další dík patří všem kolegům z laboratoře, kteří se podíleli na přípravě vzorků pro experiment, zejména Bc. Petře Zelinkové. Ráda bych také poděkovala své kolegyni a sestře Zuzaně Pilsové, se kterou jsem spolupracovala během experimentální části práce, která je klíčová pro celou práci. Zuzaně Pilsové bych také chtěla poděkovat za rady, podporu a pomoc při psaní práce. V poslední řadě patří můj dík i mé rodině za podporu po celou dobu zpracovávání bakalářské práce.

Sulfan produkující enzymy v kančích spermích

Souhrn

Sulfan, který v živých buňkách endogenně vzniká při reakcích katalyzovaných specifickými enzymy, plní funkci signální molekuly. Cílem teoretické části práce bylo shrnutí současných poznatků o funkci sulfanu zejména v samčí reprodukční soustavě a spermiogenezi. V práci jsou shrnuty základní vlastnosti sulfanu a možné cesty vzniku tohoto plynu v živých buňkách. Za produkci sulfanu jsou zodpovědné čtyři sulfan produkující enzymy. Práce byla zacílena konkrétně na cystathionin- β -syntázu, enzym, který je zodpovědný za produkci sulfanu především v centrálním nervovém systému, ale také v játrech, ledvinách, ileu, děloze, placentě, ve tkáni penisu, varlete či prostaty. Enzym byl popsán i ve spermích laboratorních hlodavců.

Cílem praktické části bylo prokázat přítomnost CBS v kančích spermích. V experimentu byly využity vzorky ejakulovaných spermí, spermí kapacitovaných s různou dobou kapacity v kapacitačním médiu a spermí kapacitovaných v médiu suplementovaném donorem sulfanu. Exprese enzymu ve spermích byla sledována imunocytochemicky a hodnocena po snímání na konfokálním mikroskopu analýzou obrazu. Přítomnost CBS byla v kančích spermích prokázána. Exprese enzymu se snižovala v závislosti na délce proběhlé kapacity.

Klíčová slova

- spermie
- cystathionin- β -syntáza
- sulfan
- reprodukce

Sulphan-producing Enzymes in Boar Sperm

Summary

Endogenous hydrogen sulphide is produced during reactions catalysed by specific enzymes and plays important role as a signalling molecule. The aim of theoretical part of this thesis was to summarize recent knowledge about hydrogen sulphide and his function in reproductive system and about spermiogenesis. The work recapitulates elemental characteristics and metabolism of hydrogen sulphide in living cells. The work was focused on cystathionin- β -synthase, which is hydrogen sulphide producing enzyme mainly in central nervous system, but also in liver, kidney, ileum, uterus, placenta, penile tissue, testis or prostate. CBS was found also in sperm of laboratory rodents.

Practical part was focused on the proof of CBS in boar sperm. During the experiment were used samples with ejaculated sperm of boar, samples of capacitated sperm in defined medium and sperm capacitated in medium supplemented with hydrogen sulphide donor. The expression of enzyme was observed by using imunocytochemistry and it was after evaluated by the scanning confocal microscope image analysis. The presence of CBS was proved in the boar sperm. The expression of enzyme was decreasing according to the duration of capatitation.

Keywords

- sperm
- cystathionin- β -synthase
- hydrogen sulphide
- reproduction

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce.....	3
3 Literární přehled.....	4
3.1 Samčí reprodukční systém	4
3.1.1 Spermatogeneze	4
3.1.2 Morfologie spermie.....	7
3.1.3 Kapacitace	9
3.1.4 Akrozomální reakce.....	10
3.2 Sulfan.....	14
3.2.1 Vlastnosti sulfanu	14
3.2.2 Produkce H ₂ S.....	15
3.2.3 Způsoby uvolnění H ₂ S.....	19
3.2.4 Katabolismus sulfanu	21
3.2.5 Mechanismy přenosu signálu.....	23
3.2.6 Sulfan produkující enzymy	26
3.2.7 Funkce sulfanu v reprodukční soustavě.....	29
3.3 Imunocytochemická metoda.....	31
4 Materiál a metody.....	33
4.1 Použité protilátky	33
4.2 Příprava vzorků.....	34
4.3 Imunocytochemické stanovení CBS	36
4.4 Statistické vyhodnocení.....	36
5 Výsledky	37

6	Diskuze	44
7	Závěr.....	46
8	Seznam literatury	47

1 Úvod

Sulfan byl ještě v minulém století znám pouze jako toxický plyn se zápachem po zkažených vejcích. Nicméně před 20 lety provedli Abe a Kimura experiment, ve kterém dokázali, že sulfan má kromě toxických vlastností zřejmě také životně důležité funkce v těle, protože popsali mechanismus endogenní produkce sulfanu v těle. Od té doby proběhlo nesčetně dalších prací a výzkumů na toto téma a v současné době dochází ke zjištění, že se sulfan podílí na velkém počtu fyziologických procesů v těle. Mezi funkce sulfanu patří například regulace činnosti nervové soustavy, vazodilatace cév, úprava buněčného cyklu, apoptózy, má vliv na oxidační stres a také se účastní zánětlivých procesů. Jak se v nedávných letech zjistilo, má vliv také na reprodukční systém (Reiffenstein & Roth 1992; Abe & Kimura 1996, Olas 2015).

Nyní se tedy sulfan řadí společně s oxidem uhelnatým a oxidem dusnatým do skupiny gasotransmiterů, plyných látek, které působí v těle jako mediátory. Pozornost vědců se mimo jiné upíná na produkci endogenního sulfanu, která se zdá být stěžejní pro pochopení jeho funkce v těle. Jak bylo ve výzkumech prokázáno, sulfan je produkován čtyřmi sulfan produkujícími enzymy. Mezi tyto enzymy se řadí cystathionin- β -syntáza (CBS), cystathionin- γ -lyáza, cystein aminotransferáza a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (Hughes et al. 2009; Tanizawa 2011; Wang 2012; Olas 2014; Xu et al. 2014). Hlavním substrátem pro tvorbu endogenního sulfanu je L-cystein, nicméně v posledních letech bylo dokázáno, že i D-cystein zaujímá místo během produkce sulfanu (Shibuya et al. 2013; Kimura 2014). Produkce sulfanu skrz D-cystein je významná, protože D-cystein má mnohem menší toxicitu než L-cystein, takže má velkou terapeutický potenciál. Enzymatická cesta produkce sulfanu však není jediná, sulfan může vznikat také během disociace hydrogen sulfidu sodného, či produkcí mikroorganismů trávicího traktu metabolizujících síru. Vyprodukovaný sulfan je dokonce v těle skladován, a to ve formě acidolabilní síry nebo síry vázající sulfan (Shibuya et al. 2013; Kimura 2014). K uvolnění sulfanu dochází, pokud jsou buňky stimulovány fyziologickým podnětem.

CBS je hlavní sulfan produkující enzym v centrálním nervovém systému. Jeho koncentrace zde závisí na věku jedince, nicméně v určitých částech mozku je produkován celý život, a to především v hipokampu a v mozečku. CBS vzniká ve většině tkání těla, bylo však zjištěno, že inzulin snižuje produkci a aktivitu enzymu, naopak například glukagon

a glukokortikoidy mají na CBS opačný efekt (Enokido et al. 2005; Ichinohe et al. 2005). Tento enzym katalyzuje kondenzaci homocysteinu s cysteinem, během které vzniká cystathionin a také sulfan. Podmínkou pro proběhnutí reakce je přítomnost vitamínu B₆ (Chen et al. 2004).

Jak se v nedávných výzkumech prokázalo, sulfan se ve značné míře nachází také v reprodukčním traktu, a to jak v samčí, tak i v samičí soustavě savců. Sulfan produkující enzymy byly detekovány ve tkáni penisu, v Sertoliho i Leydigových buňkách a taktéž v zárodečných buňkách varlete. Enzymy byly zpozorovány rovněž v hladkém svalstvu cév penisu i v jeho periferních nervech. Důležitou funkci má sulfan v kavernózních tělesech, kde je jeho účinek zkoumán především z hlediska erektilní dysfunkce. Obecně experimenty dokazují, že sulfan má vliv na vyvolání erekce u savců. Sulfan je rovněž přítomen ve spermiích a v posledních letech se objevují studie, které se tímto tématem zabývají. Výsledky vědců poukazují na to, že pro udržení mužské fertility a pro ochranu varlat je sulfan důležitý. I v prostatě u lidí dochází k produkci sulfanu a různé výzkumy prokázaly, že sulfan snižuje přežití rakovinných buněk prostaty. Také v samičím reprodukčním traktu hraje sulfan důležitou roli z hlediska správného fungování samičí reprodukce (Oi et al. 2001; Sugiura et al. 2005; Liang et al. 2006; Patel et al. 2009; Srilatha et al. 2009; d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2011; Huang et al. 2012).

Všechna tato fakta poukazují na to, že sulfan je pro tělo životně důležitá sloučenina a že výzkum působení sulfanu na buňky je důležitý, a to například i z lékařského hlediska.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo shrnout současné poznatky o enzymech, které jsou v buňkách zodpovědné za produkci gasotransmiteru sulfanu se zaměřením na cystathionin-beta-syntázu, a o funkci sulfanu při řízení reprodukčních procesů. Cílem experimentální části práce byl průkaz cystathionin-beta-syntázy (CBS) v kančích spermích.

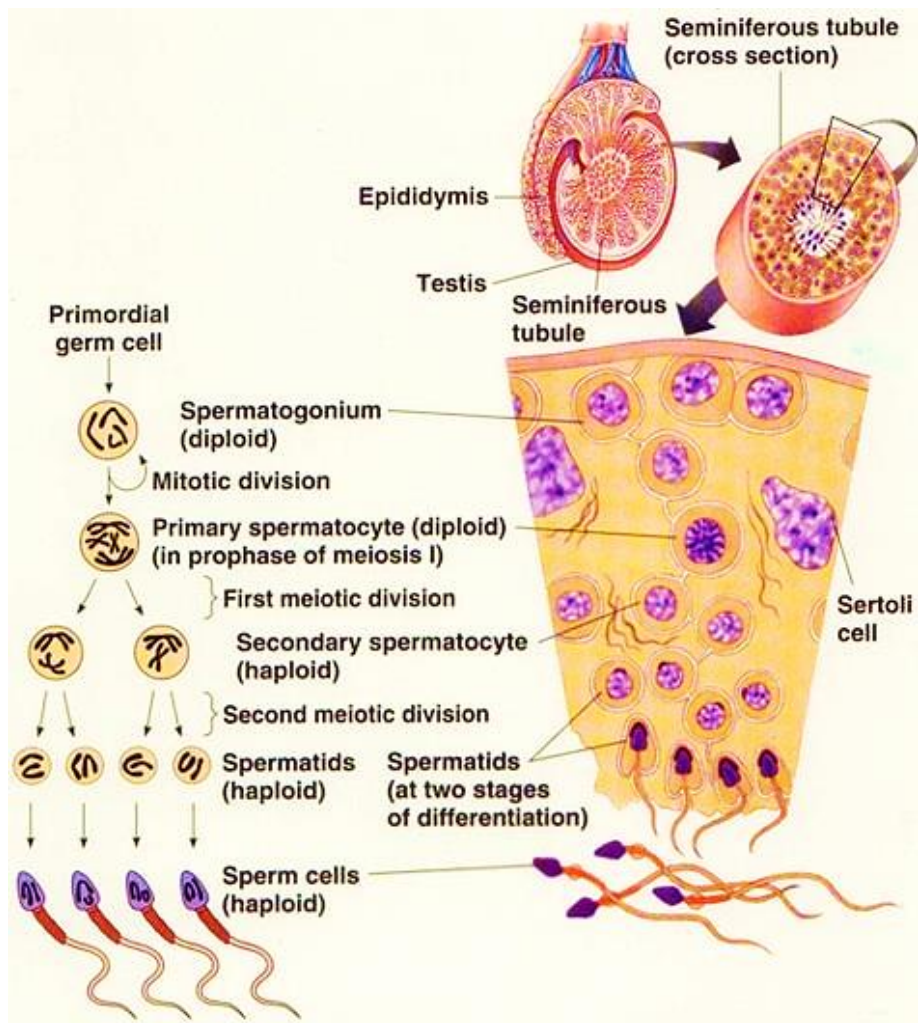
3 Literární přehled

3.1 Samčí reprodukční systém

3.1.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze probíhá ve varleti, kde se rovněž tvoří i samčí pohlavní hormon testosteron. Spermatogeneze probíhá pouze při nižších teplotách než 37 °C a teplota ve varleti se pohybuje kolem 35 °C (Junqueira et al. 1997). Spermatogeneze je lokalizována do semenotvorných kanálků varlete, ve kterých probíhají všechny fáze. Kromě zárodečného epitelu jsou ve stěnách kanálků podpůrné Sertoliho buňky, díky kterým se uskutečňuje metamorfóza spermatid ve spermie (Marvan 2017).

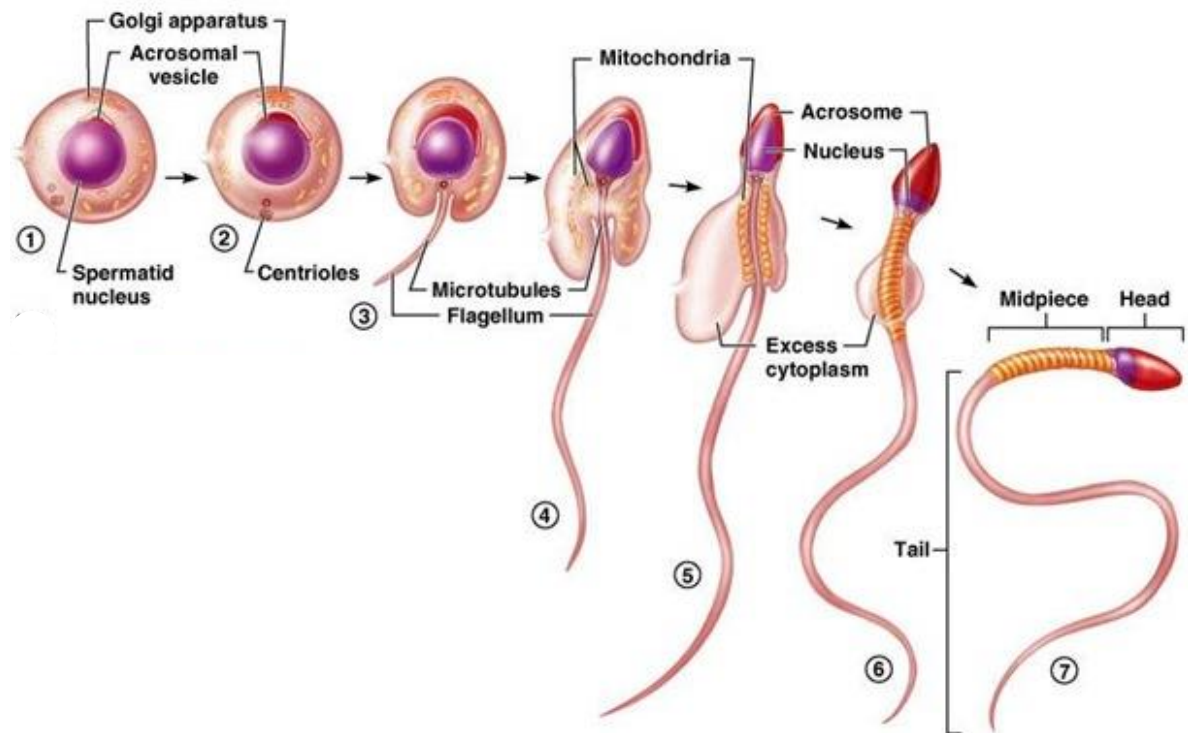
Vývoj spermií, se nazývá spermatogeneze (Obr. č. 1) Tento proces probíhá v pravidelných cyklech, každý cyklus začíná zhruba o $\frac{1}{4}$ délky později než předcházející. Délka jednoho cyklu se u kance pohybuje okolo 35 dní (Jelínek & Koudela 2003). Součástí spermatogeneze jsou 2 procesy - spermatocytogeneze a spermatohistogeneze neboli spermiogeneze. Spermatocytogenezi můžeme rozdělit na čtyři fáze (Jelínek & Koudela 2003). První fází je období rozmnožování, či období mitotického dělení. Během něj dochází k opakovanému mitotickému dělení kmenových buněk A-spermatogonií (primordiální gonocyty). Každá mateřská buňka se dělí na dvě rozdílně velké dceřiné buňky, větší se podobá mateřské buňce a zůstává v latentním stádiu (interfázi). Menší buňka se znovu několikrát dělí, čímž dochází ke vzniku B-spermatogonie. V závěru fáze dochází k dělení B-spermatogonií za vzniku spermatocytů I. řádu (Junqueira et al. 1997). Následuje období růstu, během kterého dochází ke zvětšení objemu spermatocytu I. řádu. Třetí fáze se nazývá období zrání, meiózy, či období zracích dělení. Během této fáze dojde ke dvěma po sobě následujícím dělením. Výsledkem je vznik haploidní buňky, dochází k redukci počtu chromozomů a k rekombinaci genetických vloh (Marvan 2017). Buňky vzniklé po prvním meiotickém dělení se nazývají spermatocyty II. řádu a druhým meiotickým dělením z nich vznikají čtyři haploidní spermatidy (Junqueira et al. 1997). Tyto spermatidy nesou pouze jeden pohlavní chromozom, a to buď gonozom X, nebo gonozom Y v poměru 50 : 50. V průběhu spermatogeneze dochází k tomu, že se jednotlivá stádia buněk posouvají postupně směrem k lumen semenotvorných kanálků (Jelínek & Koudela 2003).



Obr. č. 1: Spermatogeneze. Vznik haploidní spermie z diploidní spermatogonické buňky. (zdroj: Major Differences 2013)

Období metamorfózy, čili spermatohistogeneze, se vyznačuje tím, že se zakulacená a dosud nepohyblivá spermatida přetváří ve štíhlou kopinatou a pohyblivou spermii (Obr. č. 2). Tento proces probíhá ve výběžcích Sertoliho buněk (Marvan 2017). Jednotlivá stádia spermatohistogeneze se nazývají jako Golgiho stádium, stádium akrozomové čepičky, stádium kaudální manžety a stádium zrání (Jelínek & Koudela 2003). Postupně dochází k prodloužení a oploštění jádra spermatidy a k jeho posunu k apikálnímu pólu buňky, čímž vzniká hlavička spermie. Také vzniká akrozom spermie, který se vytváří z Golgiho aparátu na předním pólu jádra (Tang et al. 1982). Na vzniku akrozomu se pravděpodobně podílí kromě Golgiho aparátu také plazmatická membrána (Berruti & Paiardi 2011). Akrozom obsahuje mnoho specifických enzymů, které jsou nutné pro rozpuštění zony pellucidy a cytoplazmatického obalu vajíčka samice, což umožňuje

vniknutí spermie do vajíčka a jeho oplodnění (Junqueira et al. 1997). Mezi enzymy, které akrozom obsahuje, patří například hyaluronidáza, akrozin, proakrozin, kyselá fosfatáza, proteináza a další (Jelínek & Koudela 2003). Další vznikající částí spermie je krček. Po skončení metamorfózy se spermie uvolňují do lumen kanálků a do vývodných cest pohlavního ústrojí. Denní produkce spermií u kance je 15×10^9 (Jelínek & Koudela 2003).



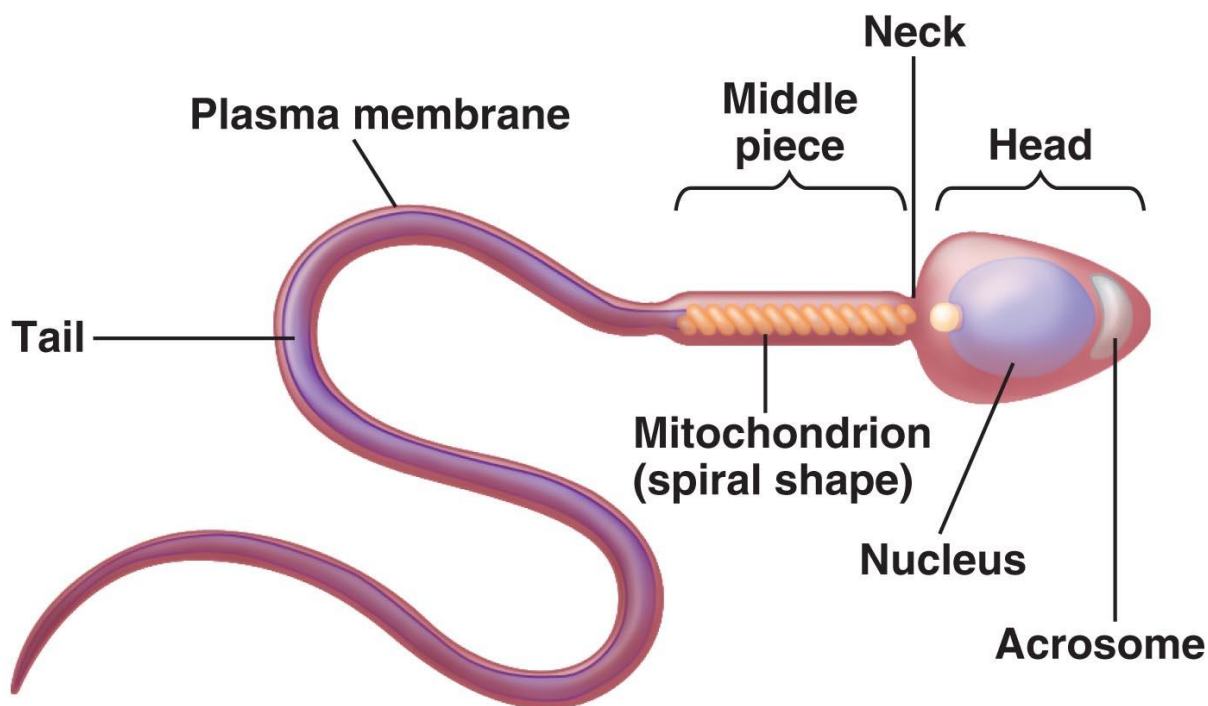
Obr. č. 2 Proces metamorfózy spermatidy ve spermii (zdroj: Major Differences 2013)

Dozrávání spermií probíhá v nadvarleti, kde se spermie shromažďují. Nacházejí se zde v anabióze, což je klidový stav, díky kterému je životnost spermií prodloužena (Jelínek & Koudela 2003). V hlavě nadvarlete dochází k zahušťování spermií a k fagocytóze poškozených či přestárých spermií. Tělo nadvarlete je důležité z důvodu zvýšení odolnosti povrchových membrán spermií, která je zajištěna sekrety bohatými například na tuky. Znakem dozrálých spermií je odloučení protoplazmatické kapky od spermie. Spermie nadvarletem prochází zhruba 8–11 dní (Jelínek & Koudela 2003). Následně se spermie dostávají do chámovodu. Při ejakulaci se spermie smísí se sekrety pohlavních žláz, které upravují prostředí pro spermie v močové trubici a také v pochvě, zároveň slouží jako přirozené ředidlo či jako energetický zdroj pro spermie.

Na řízení pohlavních funkcí se podílí hypotalamo-hypofyzární systém. Řídícím orgánem je hypotalamus a adenohipofýza, následují gonády a vývodné pohlavní cesty. Liberiny z předního sexuálního centra hypotalamu podporují produkci gonadotropin releasing hormonu ze zadního sexuálního centra. Dalšími nezbytnými hormony pro správné fungování reprodukčního systému jsou gonadotropní hormony - folikulostimulační a luteinizační hormon vznikající v adenohipofýze. Mezi další hormony ovlivňující reprodukci u samců patří inhibin, který vzniká v Sertolihových buňkách, a androgeny (například testosteron), jejichž tvorba je lokalizována v Leydigových buňkách varlat. Sekrece hormonů funguje na principu negativní a pozitivní zpětné vazby (Cummins & Woodall 1985).

3.1.2 Morfologie spermie

Hlavička spermie je 5–10 μm dlouhá, hlavička kančí spermie je oválná (Dvořáková et al. 2005). V přední části je kryta akrozomem (Longo 1987), který obsahuje mukopolysacharidy a mnohé enzymy umožňující penetraci spermie do vajíčka a jeho následné oplození. Hlavička je tvořena hlavně jádrem, které obsahuje kondenzovaný chromatin s DNA nesoucí genetickou informaci (Fawcett 1975). Krček spojuje hlavičku a bičík spermie a je tvořen dvěma za sebou uloženými centriolami, jeho délka je 2–3 μm . Bičík zajišťuje pohyblivost spermie a jeho délka u kančích spermií je 31–45 μm (Cummins & Woodall 1985). Bičík se dělí na spojovací, hlavní a terminální oddíl. Krček přechází ve spojovací neboli mitochondriální oddíl bičíku. Tento oddíl je tvořen vysokým počtem mitochondrií (Jelínek & Koudela 2003). Mitochondrie jsou důležitým zdrojem energie pro pohyb spermie. Nejdelším oddílem bičíku je hlavní oddíl. Podkladem obou oddílů je osová vlákna obklopená nesegmentovanými chordami a obalená fibrózní pochvou. Pochva slouží k zabezpečení soudržnosti osových vláken, jejich pevnosti a pružnosti při kmitání bičíku. Osová vlákna je tvořena přibližně z 250 proteinů (Cosson 1996). Terminální oddíl bičíku je dlouhý zhruba 4 μm a tvoří jej pouze osová vlákna bez chord a fibrózní pochvy (Obr. č. 3). Spermie jsou velmi variabilní, přehled jednotlivých délek spermií a jejich částí u jednotlivých druhů zvířat je znázorněn v Tab. č. I.



Obr. č. 3: Jednotlivé části spermie - hlavička s akrozomem a jádrem, krček, spojovací (mitochondriální) oddíl bičíku, bičík a plazmatická membrána (zdroj: StudyPage.in 2007)

Tab. č. I: Přehled délek spermií u různých živočišných druhů. Uvedené délky jsou v μm

Druh	Celková délka	Délka hlavičky	Délka bičíku ^(a)	Délka střední části bičíku	Délka hlavní části bičíku
Býk	75–80	10	65–70	9–11	36–54
Kanec	48–54	6 - 8	31–45	10	21–36
Myš	122–124	8	116	21	95
Člověk	56–59	4,5	54	4–5	46

(Zdroj: Cummins & Woodall 1985)

^(a) Celková délka bičíku zahrnuje i délku krčku spermie

Celou spermii pokrývá a chrání nepřerušovaná dvouvrstevná cytoplazmatická membrána (Obr. č. 3). Mezi její vlastnosti patří acidorezistence, vysoká permeabilita, je však citlivá na změny osmotického tlaku. Díky permeabilitě membrány dochází k látkové výměně mezi spermii a jejím prostředím. Cytoplazmatická membrána u živých spermií nepropouští některá barviva (například eozin, fluorochromy), a proto je možné rozlišení živých a mrtvých spermií pomocí vitálně letálního barvení (Jelínek & Koudela 2003). Při dlouhodobé

konzervaci spermií (například při zmrazování) může docházet k poškození permeability membrány spermií, čímž se sníží oplozovací schopnost spermií. Průměrná koncentrace spermií je často nepřímo úměrná průměrnému objemu ejakulátu u různých druhů zvířat.

3.1.3 Kapacitace

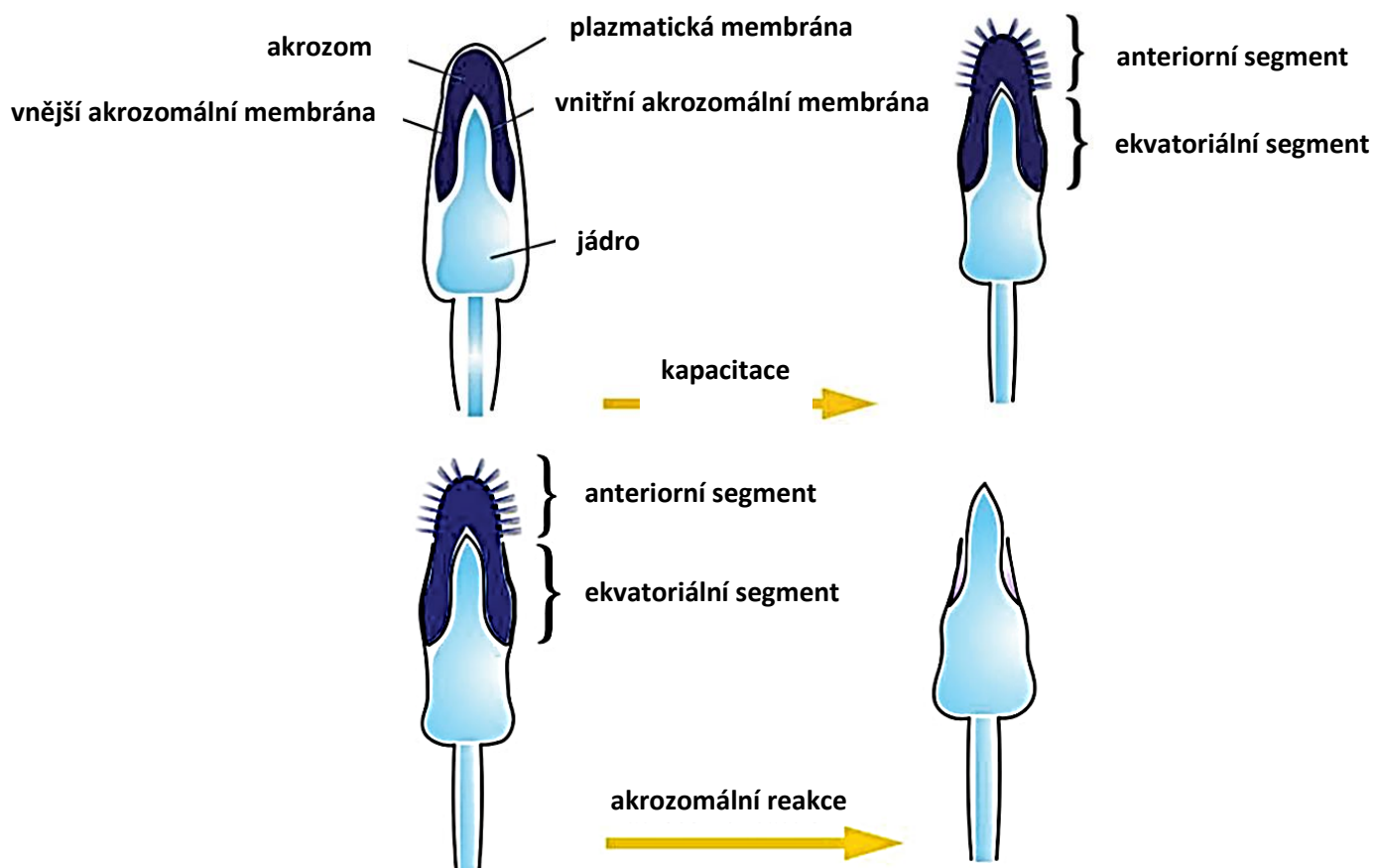
Po vstupu spermií do samičího pohlavního ústrojí je důležitý jejich co nejrychlejší transport do vejcovodů, protože podmínky v reprodukčním traktu samic nejsou pro spermie nejvhodnější. K transportu spermií dochází hlavně pasivně, důležitou roli zde hraje semenná plazma, která slouží spermiím jako transportní prostředí. Zdejší kyslejší prostředí snižuje také aktivitu spermií, čímž je zajištěna jejich delší životnost. Do ampul vejcovodů se spermie dostávají před začátkem ovulace, aby mohlo dojít k oplodnění vajíčka. Aby spermie získaly schopnost proniknout přes vaječné obaly, musí dojít nejprve k jejich kapacitaci a dozrání. K tomu dojde až po několika hodinách strávených v samičím pohlavním ústrojí. Když spermie překonají dělohu a dorazí do isthmu, váží se reverzibilně na epitel vejcovodu (Eisenbach 1999). V tomto stádiu dochází ke kapacitaci spermií. Během kapacitace dochází k mnoha fyziologickým změnám. Dochází k odstranění zbytků semenné plazmy, která dosud pokrývala povrch spermií. Součástí semenné plazmy jsou například inhibitory enzymů a kapacitace samotné (Chang 1957; Bedford 1970; Jaiswal & Eisenbach 2002). Probíhá také látková výměna. Kapacitace je následována akrozomální reakcí. Doba kapacitace se liší u různých druhů zvířat, například u spermií kance trvá 4–6 hodin (Jelínek & Koudela 2003).

Ne všechny spermie projdou procesem kapacitace najednou. V daném okamžiku dojde ke kapacitaci pouze malé části spermií (zhruba 10 %) s relativně snadným zvratem mezi kapacitovanými a nekapacitovanými spermii (Jaiswal & Eisenbach 2002). Kapacitace má dva hlavní účinky na spermie z hlediska schopnosti oplodnění vajíčka. Prvním z nich je to, že se spermie stanou „hyperaktivními“. Tato hyperaktivita spermií se projevuje tím, že se zvýší amplituda a asymetrie pohybů bičíků, což je důležité pro to, aby se spermie dokázaly osvobodit z vazby na epitel vejcovodů a následně pokračovat směrem k vajíčku, aby mohly proniknout jeho vnějšími obaly (Demott & Suarez 1992; Stauss et al. 1995). Druhý účinek spočívá v „odhalení“ proteinů důležitých pro interakci mezi spermií a vajíčkem z důvodu odstranění či změn na plazmatické membráně spermie (Jaiswal & Eisenbach 2002; Sutovsky 2011). V této chvíli se poprvé uvolňují proteiny, které jsou nutné během interakce vajíčka a spermie (Springate & Frasier 2017). Dochází také ke ztrátě

některých povrchových uhlovodíků a proteinů, zvyšuje se tekutost plazmatické membrány kvůli snížené koncentraci cholesterolu. Otevírají se iontové kanály, což vede k hyperpolarizaci plazmatické membrány spermie. Změnou prochází i cytoskeletární proteiny, některé proteiny jsou fosforylovány a mnohé signální dráhy jsou během kapacitace aktivovány (Yanagimachi 1994; Bedford & Cross 1998; Florman & Ducibella 2014). Po kapacitaci se spermie posouvají vejcovodem směrem k vajíčku, jsou pravděpodobně navigovány kombinací termotaxe, chemotaxe a kontrakcí vejcovodu (Springate & Frasier 2017). Pouze kapacitované spermie jsou schopné proniknout skrz buňky obklopující membránu vajíčka (Jaiswal & Eisenbach 2002). Výzkumy prokázaly, že spermie, které nepodstoupí kapacitaci, nejsou schopné oplození. Také vzhledem k jejich výrazně pomalejšímu pohybu k vajíčku většinou ani nedospějí (Yanagimachi 1994; Bedford & Cross 1998).

3.1.4 Akrozomální reakce

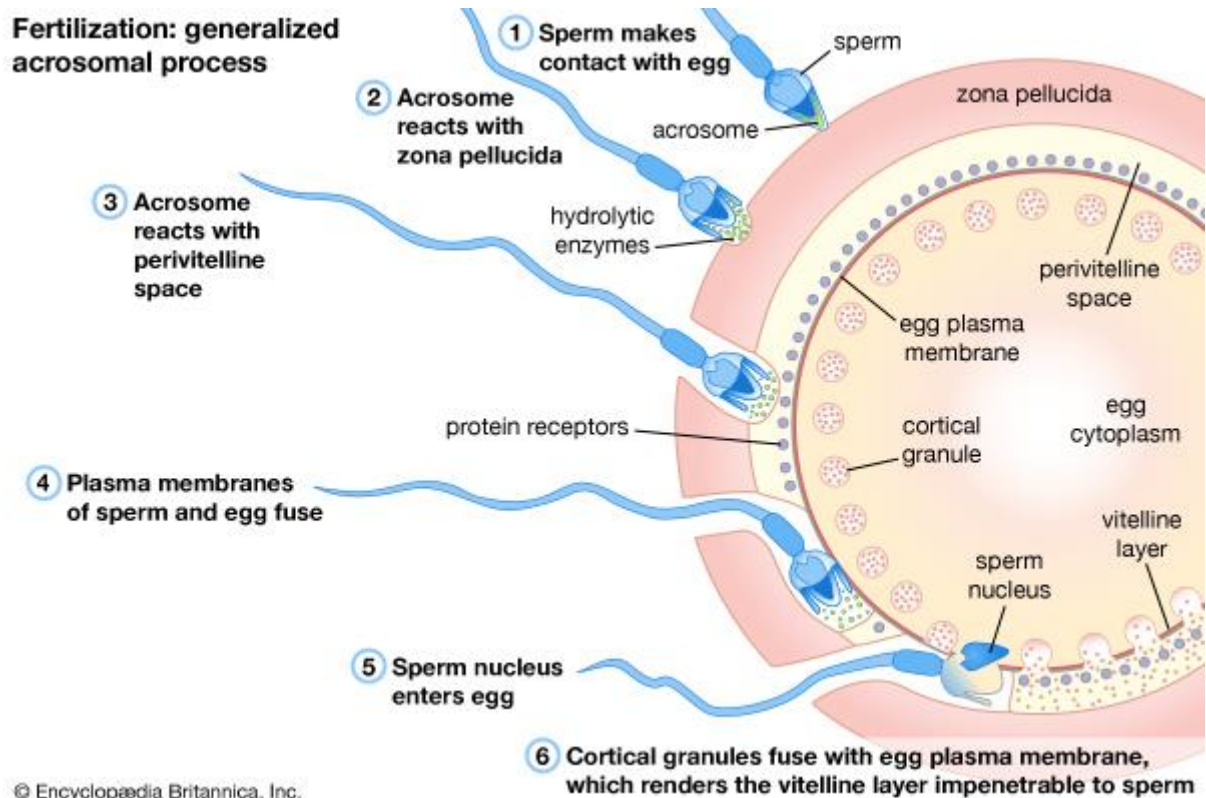
Aby byly spermie schopné proniknout obaly vajíčka a vajíčko oplodnit, musí nejprve proběhnout akrozomální reakce. Spermie, u kterých se akrozom během spermatogeneze nevyvinul, nejsou schopné oplození (Kang-Decker et al. 2001; Dam et al. 2007; Lin et al. 2007). Akrozom má dvě části, první je velký anteriorní segment a druhá se nazývá menší posteriorní segment (či ekvatoriální), který se nachází ve střední části hlavičky spermie. Akrozom ohraničuje akrozomální membrána, která se dělí na vnější akrozomální membránu, jež je lokalizována pod plazmatickou membránou spermie, a na vnitřní akrozomální membránu, která obepíná jádro spermie (Obr. č. 4) (Gerton 2002; Kopf 2002). Díky těmto vrstvám je vytvořen akrozomální váček obsahující enzymy potřebné pro průchod spermie glykoproteinovým obalem vajíčka.



Obr. č. 4: Struktura hlavičky spermie a akrozomu. Obrázek znázorňuje hlavičku spermie obsahující jádro s haploidním počtem chromozomů a sekreční organelu akrozom. Akrozom má dvě membrány - vnější a vnitřní. Obrázek znázorňuje také anteriorní a ekvatoriální segment akrozomu a změny akrozomu během akrozomální reakce (zdroj: Wassarman et al. 2004; Okabe 2013)

Během akrozomální reakce plazmatická membrána a vnější membrána akrozomu splývají a dojde k uvolnění látek obsažených v akrozomálním váčku (Springate & Frasier 2017). Během akrozomální reakce dochází k aktivaci akrozomových enzymů a k vezikulaci úseků vnější membrány akrozomu. Akrozom zde slouží jako specializovaný typ lysozomu. Když se spermie setká s oocytem, zevní membrána akrozomu splývá s cytoplazmatickou membránou a dojde k uvolnění akrozomálních enzymů exocytózou do extracelulárního prostředí (Austin & Bishop 1958; Fléchon 2016). Enzymy obsažené v akrozomální čapce oddělují buňky corona radiata a narušují zonu pellucidu, což jsou obaly obklopující vajíčko po ovulaci (Obr. č. 5) (Junqueira et al. 1997).

Během této reakce také dochází k uvolnění proteinů, jež byly navázány na vnitřní akrozomální membránu. Akrozomální reakcí dochází k obnažení této membrány. Proteiny zde obsažené následně interagují s plazmatickou membránou vajíčka během oplodnění (Gerton 2002; Wassarman et al. 2005). Bodem kontaktu spermie s vajíčkem po zdolání cesty skrz zonu pellucidu není špička hlavičky spermie, ale spíše ekvatoriální oblast jedné ze stran spermie (Okabe 2013). Z toho plyne, že proteiny obsažené v této oblasti jsou pravděpodobně klíčem ke sloučení gamet v této fázi oplodnění (Springate & Frasier 2017). Dříve se myslelo, že se akrozomální reakce spustí, když proteiny uvolněné z hlavičky spermie, které byly odkryty během kapacitace, interagují s proteiny na zoně pellucidě. Mnoho studií prokázalo, že zona pellucida a zejména glykoprotein ZP 3 mají schopnost vázat spermie a mohou spustit akrozomální reakci (Litscher & Williams 2009). Navíc během reakce dojde k uvolnění enzymů, které rozpouští zonu pellucidu, čímž vytvoří otvor, skrz který mohou procházet spermie (Wassarman et al. 2001). Nicméně nedávné studie upozorovaly, že minimálně u myší není tohle jediný možný způsob prostupu spermií do vajíčka. Spermie mohou podstoupit akrozomální reakci dříve, než interagují se zónou pellucidou, a dokonce ještě dříve, než se setkají s buňkami obklopujícími vajíčko (Jin et al. 2011; La Spina et al. 2016). Dnes nejsou přesně známy spouštěče akrozomální reakce, ani její přesná lokalizace. Je stále pravděpodobné, že roli při spouštění akrozomální reakce hraje interakce se zónou pellucidou, ale není známo, jakou přesně roli interakce hraje a není jisté, jak moc je zásadní pro tento proces (Springate & Frasier 2017). Jedna z možností je, že interakce s glykoproteiny zóny pellucidy ZP3 spíše můžou usnadnit dokončení akrozomální reakce, než že by byli hlavním klíčem k jejímu zahájení (Jin et al. 2011).



Obr. č. 5: Průběh akrozomální reakce. (1) Spermie se dotýká zony pellucidy; (2) dochází k uvolnění hydrolytickým enzymů, které natráví zonu pellucidu a vytvoří otvor pro spermii; (3) proteiny spermie se váží na proteinové receptory vajíčka; (4) plazmatická membrána spermie a vajíčka splývá; (5) jádro spermie vstupuje do vajíčka; (6) kortikální granula splývají s plazmatickou membránou vajíčka, což způsobí neprostupnost žloutkového obalu pro spermie (zdroj: Monroy 2018)

3.2 Sulfan

3.2.1 Vlastnosti sulfanu

Sulfan (H_2S) je bezbarvý plyn se silným zápachem po zkažených vejcích. Byl po mnohá staletí znám pouze jako toxický plyn a plyn znečišťující životní prostředí. Jeho toxicita je dána tím, že je silným inhibitorem mitochondriální cytochrom c oxidázy. H_2S je dokonce silnější inhibitor buněčného dýchání než kyanid (Reiffenstein & Roth 1992). Nicméně nedávné studie poukazují na to, že kromě oxidu uhelnatého (CO) a oxidu dusnatého (NO) je H_2S dalším produkovaným plynem ve tkáních savců. Je účastníkem mnoha fyziologických dějů (reguluje například činnost nervové soustavy, vazodilataci cév a také reprodukci), což znamená, že má v těle důležitou funkci jakožto regulační mediátor (Reiffenstein & Roth 1992). Upravuje také buněčný cyklus, apoptózu, oxidativní stres a také se účastní zánětlivých procesů (Olas 2015).

Endogenní sulfan byl poprvé nalezen v mozku na konci 80. let minulého století, zpočátku se však myslelo, že ve tkáních savců vzniká po smrti (Nagata et al. 1990). Tehdy totiž dochází ke značnému zvýšení koncentrace tohoto plynu. H_2S se může v těle snadno uvolnit během preparace (Iciek et al. 2005). To, že může sulfan figurovat jako endogenní neurotransmitter, bylo poprvé předloženo zhruba před 20 lety Abem & Kimurou (1996), kteří popsali enzymatický mechanismus produkce sulfanu, jeho biologické účinky za fyziologických koncentrací a jeho cílové místo působení. V dnešní době je sulfan zahrnut do skupiny gasotransmiterů společně s NO a CO. Nicméně o fyziologickém působení H_2S je toho známo méně než o předešlých dvou gasotrasmiterech.

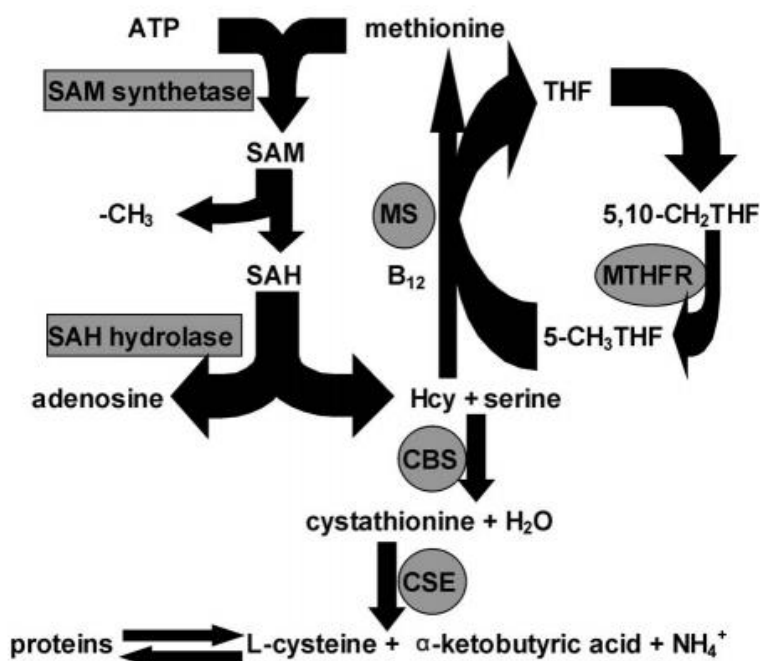
Za fyziologických podmínek, to znamená ve vodném roztoku s pH 7,4, jedna třetina sulfanu nedisociuje, dvě třetiny však disociují na H^+ a HS^- (hydrogensulfidový anion), který se může později rozdělit na H^+ a S^{2-} (sulfidový anion). Tato reakce probíhá pouze za vysokého pH, takže S^{2-} se v těle ve větším množství nevyskytuje. Jako donor H_2S se běžně využívá hydrogen sulfid sodný (NaHS), který disociuje na Na^+ a HS^- - ten se pak částečně váže na H^+ a vytváří nedisociovaný H_2S . Podobně jako NO a CO i sulfan prochází volně skrz membrány, ačkoliv kvůli částečné disociaci je membrána pro sulfan méně propustná než pro druhé dva plyny. H_2S může být detekován v krevním séru a ve většině tkání v koncentracích okolo 50 μM . Fyziologická úroveň tohoto plynu v mozku je až třikrát větší

než v krevním séru a blíží se ke koncentraci, která je pro tělo toxická (Łowicka & Beftowski 2007). Tan et al. (2010) se domnívá, že pokud je koncentrace sulfanu v mozku ve fyziologických podmínkách, tato molekula podporuje přežívání buněk svými neuroprotektivními účinky na neurony a gliové buňky v CNS. Také předpokládá, že sulfan působí jako primární posel v CNS, protože má krátký poločas rozpadu a aktivuje/inhibuje především molekuly, které působí jako poslové, a iontové kanály (Tan et al. 2010). Na druhou stranu, pokud je koncentrace sulfanu vyšší než fyziologická (k čemuž může dojít například při ischemii), H_2S tkáň poškozuje, což není překvapující, protože mnoho let byl sulfan považován za jedovatý plyn (Tan et al. 2010). Nicméně koncentrace sulfanu v různých tkáních člověka závisí na věku objektu a metodě, která je použita k jeho měření (Olas 2014; Olson et al. 2014).

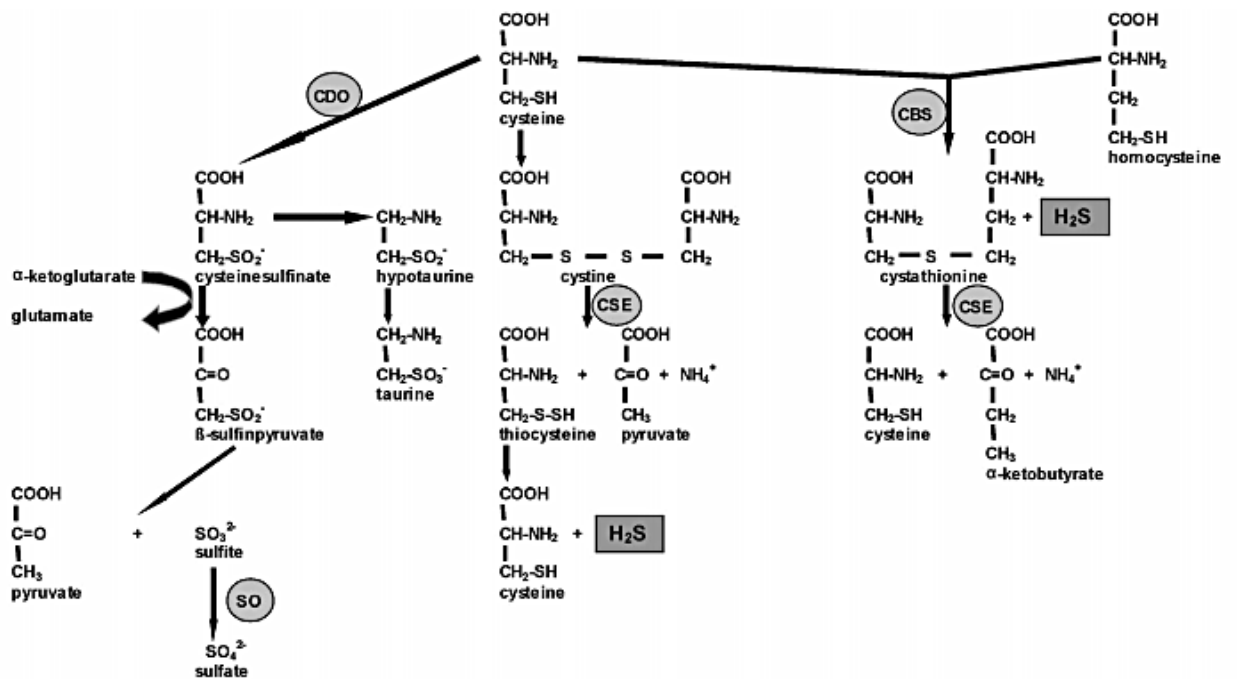
3.2.2 Produkce H_2S

H_2S je produkován ve většině tkání v různých koncentracích. Například koncentrace sulfanu v plazmě je v rozpětí 34–65 μM (Whiteman & Moore 2009), nicméně podle výsledků Olsona (2009) dosahují koncentrace H_2S v plazmě nebo v krvi 30–300 μM . Nejvyšší produkce sulfanu byla pozorována v mozku (až třikrát vyšší koncentrace než v krevním séru), kardiovaskulárním systému, v játrech a v ledvinách. Hlavním substrátem pro tvorbu endogenního H_2S je L-cystein, který se tvoří z L-methioninu cestou transsulfurace, jejímž meziproduktem je homocystein. L-cystein může být také uvolněn z endogenního proteinu (Obr. č. 6). Existují dvě hlavní cesty cysteinového katabolismu (Stipanuk 2004; Iciek et al. 2005) (Obr. č. 7). První z nich je oxidace -SH skupiny cysteinu enzymem cystein dioxygenázou za vzniku cystein sulfinátu, který může být dekarboxylován na hypotaurin nebo přeměněn na pyruvát a siřičitan, který je následně oxidován na síran. Druhá cesta je spojena s odstraněním atomu síry z cysteinu, aniž by došlo k jeho oxidaci, a ve výsledku je produktem H_2S . Tento proces je označován jako „desulfhydratace“ a může být katalyzován dvěma enzymy, které doprovázejí cestu transsulfurace homocysteinu. Jedná se o cystathionin- β -syntázu (CBS) a cystathionin- γ -lyázu (CSE). Oba enzymy jsou závislé na vitamínu B₆ (pyridoxal-5-fosfát), ale liší se mechanismem tvorby sulfanu (Obr. č. 7). CSE katalyzuje přeměnu cystinu (dvě molekuly cysteinu spojené disulfidickými můstky) na thiocystein, pyruvát a amoniak. Thiocystein se samovolně rozkládá na cystein a H_2S .

Mechanismus produkce H_2S pomocí CBS pravděpodobně zahrnuje kondenzaci homocysteinu s cysteinem za vzniku cystathioninu. Během této reakce dojde k uvolnění H_2S (Chen et al. 2004). Tato reakce je podobná transsulfurační cestě, která je rovněž katalyzována CBS (Obr. č. 6). V transsulfurační reakci ale homocystein kondenzuje se serinem za vzniku cystathioninu, v desulfhydratační reakci však s cysteinem. Rozdíl je také v produktu reakce. V obou reakcích vzniká cystathionin, v transsulfurační reakci se ale uvolní voda, zatímco během kondenzace homocysteinu a cysteinu se uvolní sulfan.



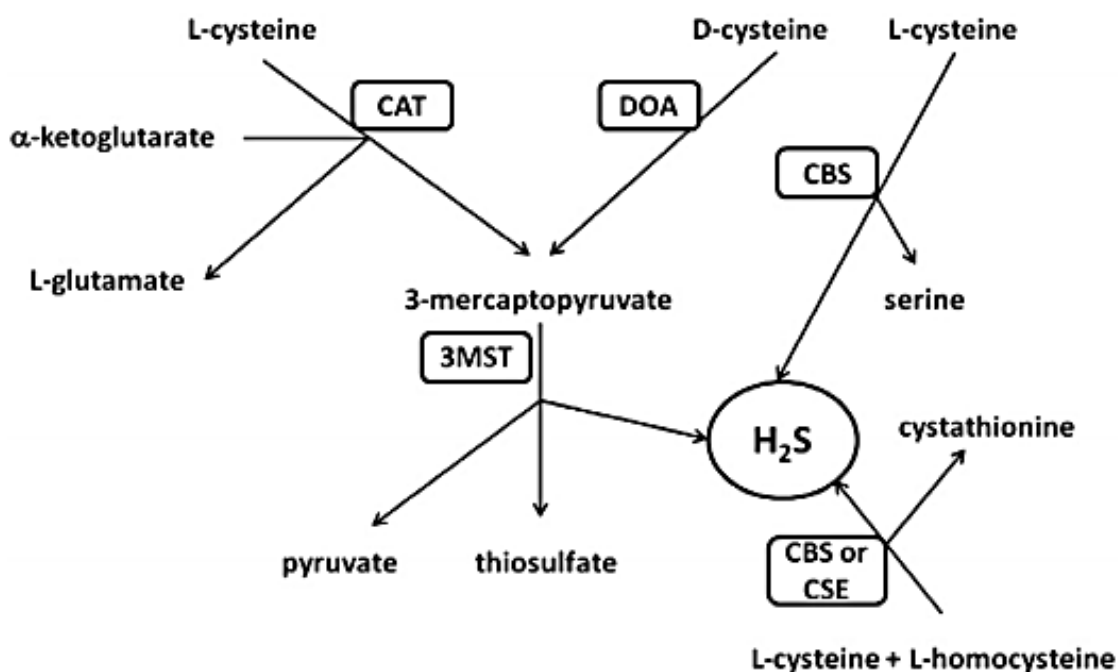
Obr. č. 6: Metabolismus homocysteinu a syntéza cysteinu. Homocystein je odvozen od methioninu, který je nejprve transformován na S-adenosylmethionin (SAM). SAM je donorem methylových skupin v mnoha methylačních reakcích. Během těchto reakcí je SAM transformován na S-adenosylhomocystein (SAH), který je poté rozložen na homocystein (Hcy) za působení SAH hydrolázy. Hcy může být remetylován na methionin díky methionin syntáze (MS), která využívá vitamínu B₁₂ jako kofaktoru a 5-methyltetrahydrofolátu (5-CH₃THF) jako donoru methylové skupiny. 5-CH₃THF vzniká z 5, 10-methylenetetrahydrofolátu (5, 10-CH₂THF) pomocí methylenetetrahydrofolát reduktázy (MTHFR). Hcy je dále metabolizován na cystein nejprve za působení cystathionin-β-syntázy (CBS) za vzniku cystathioninu a následně cystathionine γ-lyázy (CSE) (Zdroj: łowicka & Beltowski 2007)



Obr. č. 7: Metabolismus cysteinu. CBS - cystathionin β-syntáza, CDO - cystein dioxygenáza, CSE - cystathionin γ-lyáza, SO - siřičitan oxidáza (Zdroj: Łowicka & Bełtowski 2007)

Nedávné výzkumy poukazují na to, že k produkci sulfanu může být využit také D-cystein (Shibuya et al. 2013; Kimura 2014). Ten je katalyzován diaminoxydázou (DOA) na achirální 3-merkaptopyruvát, který je produkován cystein aminotransferázou (CAT) z L-cysteinu za přítomnosti α-ketoglutarátu (Kimura 2014) (Obr. č. 8). Sulfan vzniká z 3-merkaptopyruvátu následným působením 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázy (3 MST). Možné zdroje D-cysteinu jsou 2: buď vznikem inverzí z L-cysteinu (katalyzované racemázou) nebo z jídla. Je možné, že serin racemáza mění L-cystein na D-cystein (Shibuya et al. 2013), protože cystein je strukturálně velmi podobný serinu (místo skupiny OH má skupinu SH) (Shibuya et al. 2013). Také aspartát racemáza je pravděpodobně schopná měnit L-cystein na D-cystein, protože je homologní s CAT, která má afinitu jak k aspartátu, tak k cysteinu (Ubuka et al. 1978; Shibuya et al. 2013). Tyto metabolické dráhy jsou funkční hlavně v mozku (konkrétně v mozečku) a v ledvinách (Shibuya et al. 2013; Kimura 2014). Produkce sulfanu z D-cysteinu je v mozečku dokonce větší než v jiných částech mozku, produkce H₂S v ledvinách je dokonce až 7x větší než v mozečku. V ledvinách je produkce sulfanu z D-cysteinu 80x větší než z L-cysteinu (Shibuya et al. 2013; Kimura 2014). Sulfan produkovaný D-cysteinem chrání mozečkové neurony proti oxidačnímu stresu

způsobeného peroxidem vodíku a také zmírňuje ischemicko-reperfúzní poškození ledvin (Shibuya et al. 2013).



Obr. č. 8.: Metabolické cesty H₂S syntézy z L a D-cysteinu. CAT - cystein aminotransferáza, DOA - diaminoxydáza, CBS - cystathionin-β-syntáza, 3 MST - 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza, CSE - cystathionin-γ-lyáza (zdroj: Olas 2015)

Podle Wedmann et al. (2014) produkci sulfanu ovlivňuje také to, co je zdrojem sulfanu v buňkách. Způsobů, jak dostat sulfan do buněk, je více. Nejběžnější jsou sloučeniny jako hydrogensulfid sodný (NaHS) a sulfid sodný. Obě sloučeniny způsobí rychlé zvýšení tvorby sulfanu. NaHS disociuje na Na⁺ a HS⁻ a poté se částečně váže s H⁺ za vzniku nedisociovaného sulfanu (Łowicka & Beltowski 2007). Dalším zdrojem sulfanu můžou být mikroorganismy trávicího traktu, které metabolizují síru (Macfarlane et al. 1992).

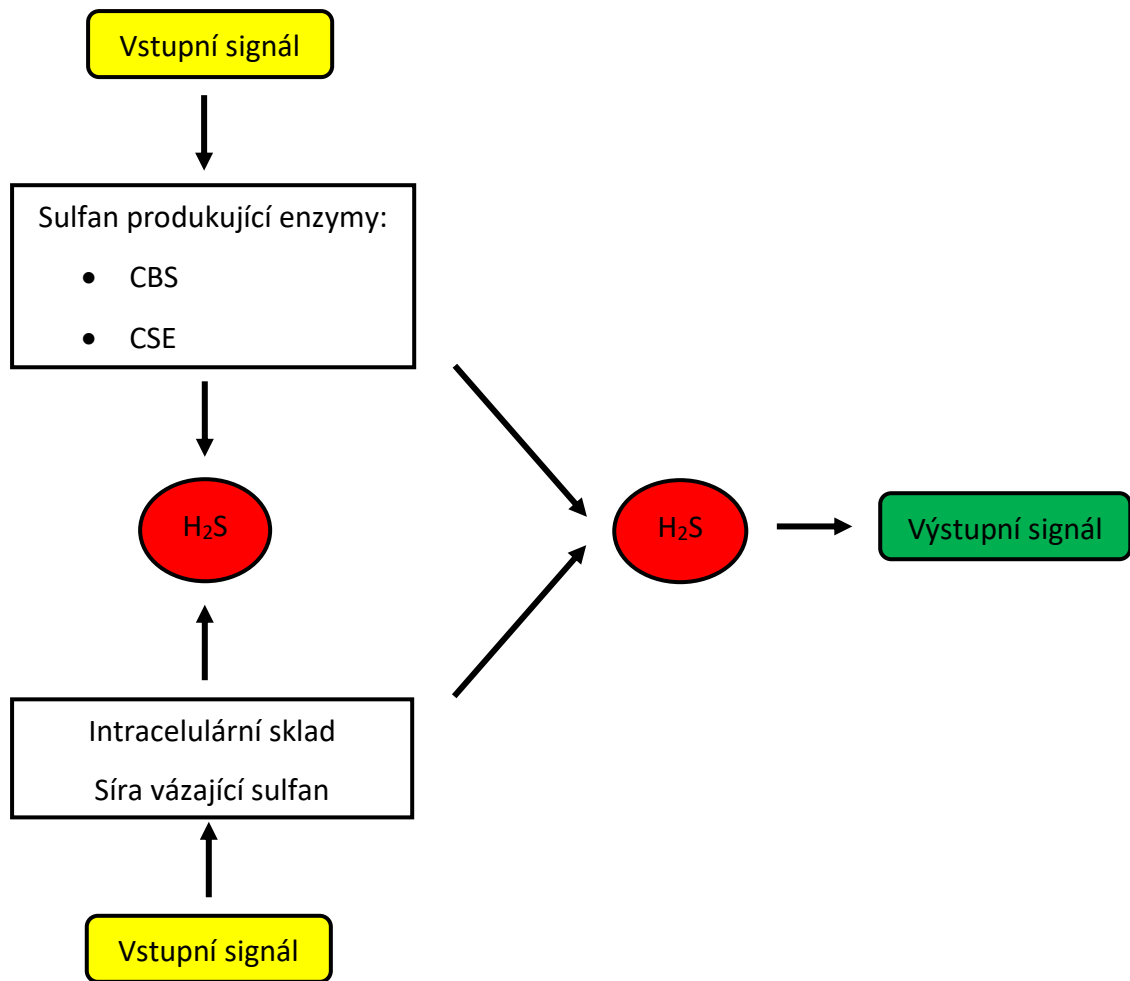
CBS i CSE jsou distribuovány do tkání v poměrně velkém množství, nicméně CBS je převažujícím zdrojem sulfanu v centrálním nervovém systému (CNS), zatímco CSE je hlavní sulfan produkující enzym v kardiovaskulárním systému. V některých tkáních (například v játrech, ledvinách), jsou zastoupeny oba enzymy. Obecně se předpokládá, že kvantitativně převažující cesta katabolismu cysteinu je skrz dioxygenázu, nicméně některé výzkumy na buněčných kulturách kultivovaných v *in vitro* podmínkách dokazují,

že desulfhydratace s následnou produkcí sulfanu tvoří v některých tkáních (například v renálních tubulárních buňkách) až 50 % metabolismu cysteinu (Stipanuk et al. 1990).

3.2.3 Způsoby uvolnění H₂S

Mechanismy uvolnění sulfanu v těle jsou minimálně dva. K okamžitému uvolnění sulfanu dochází po jeho produkci enzymy. Další možný způsob je ten, že produkovaný H₂S je uskladněn a následně uvolněn v odpovědi na fyziologický signál (Kimura 2011). Zatím byly popsány dvě formy skladování sulfanu v buňkách (Toohey 1989; Ogasawara et al. 1993). V kyselém prostředí se H₂S uvolňuje z acidolabilní síry. Další forma skladování sulfanu se nazývá sulfan vázající síra (bound sulfane sulfur), která uvolňuje sulfan v redukčních podmínkách (Ogasawara & Tanabe 1994). Acidolabilní síra se skládá hlavně z atomů síry v železito-sirných komplexech, což hraje důležitou roli v mnoha redoxních reakcích při působení enzymů v respiračním řetězci v mitochondriích. Hranice pH, které je potřebné pro uvolnění sulfanu z acidolabilní síry, je 5,4 (Ishigami et al. 2009). Protože pH v mitochondriích je mezi 7 a 8, což je vyšší než výše zmíněná hodnota, za fyziologických podmínek zde pravděpodobně k uvolnění H₂S z acidolabilní síry nedochází.

Síra ze sulfanu může být zabudována do proteinů, čímž vzniká sulfan vázající síra, což je oxidační forma bílkovinných polysulfidů. Síra zde je dvojmocná a váže se pouze s dalším atomem síry, jako se váží například atomy síry v disulfidech nebo ve vnitřním řetězci polysulfidů. Takto uskladněný sulfan byl nalezen například v neuronech v astrocytech v mozku (Ishigami et al. 2009). Cystein je metabolizován proto, aby produkoval sulfid, který bude zabudován do zásob sulfan vázající síry (Obr. č. 9) (Daniels & Stipanuk 1982). Pokud je do těla aplikován volný exogenní sulfan, je okamžitě absorbován do skladů sulfanu ve formě sulfan vázající síry, což je předpoklad k tomu, že enzymaticky produkovaný sulfan může být také uskladněn v sulfan vázající síře (Ishigami et al. 2009). Buňky, které produkují 3 MST a CAT, zvyšují úroveň sulfan vázající síry oproti buňkám, které produkují chybný a zmutovaný 3 MST, jenž sulfan neprodukuje (Nagahara & Nishino 1996; Shibuya et al. 2009a; Shibuya et al. 2009b).



Obr. č. 9: Sulfan vázající síra je sklad H_2S . Sulfan produkovaný enzymy funguje jako signální molekula. Může být skladován také ve formě sulfan vázající síry, ze které se H_2S může uvolnit, pokud k buňkám dorazí fyziologický podnět. (Zdroj: Kimura 2011)

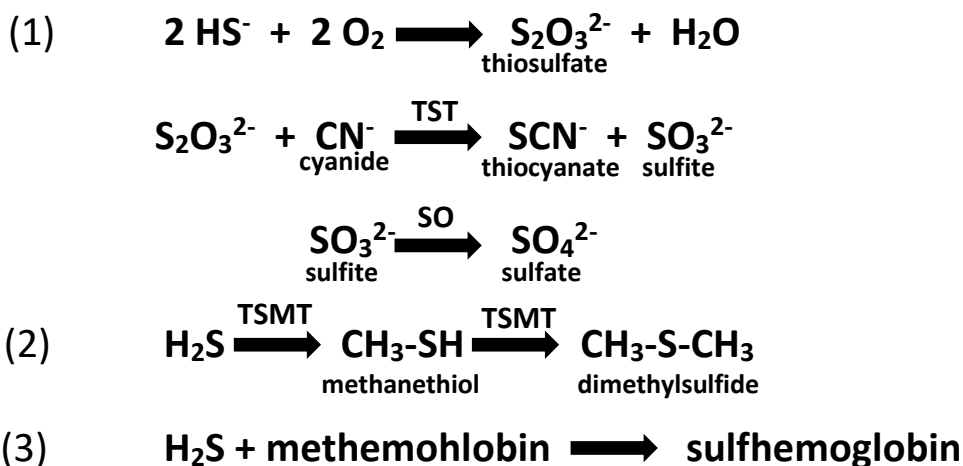
Zatím není zjištěno, co přesně reguluje koncentraci H_2S ve tkáních nebo v krvi, mechanismus regulace sulfanu není tedy znám. Bylo ale zpozorováno, že v CNS se sulfan chová jako posel v odpovědi na specifické podněty (většinou škodlivé), například při horečnatých záchvatech (Han et al. 2005), při podnětech vedoucích k bolesti (Kawabata et al. 2007) nebo při mozkové ischemii (Qu et al. 2006). Je nepravděpodobné, že je koncentrace sulfanu vnímána nějakými senzory nebo regulována homeostázou, k uvolnění sulfanu dochází spíše v odpovědi na nějaký podnět, pravděpodobně jako při uvolnění katecholaminů (Tan et al. 2010).

3.2.4 Katabolismus sulfanu

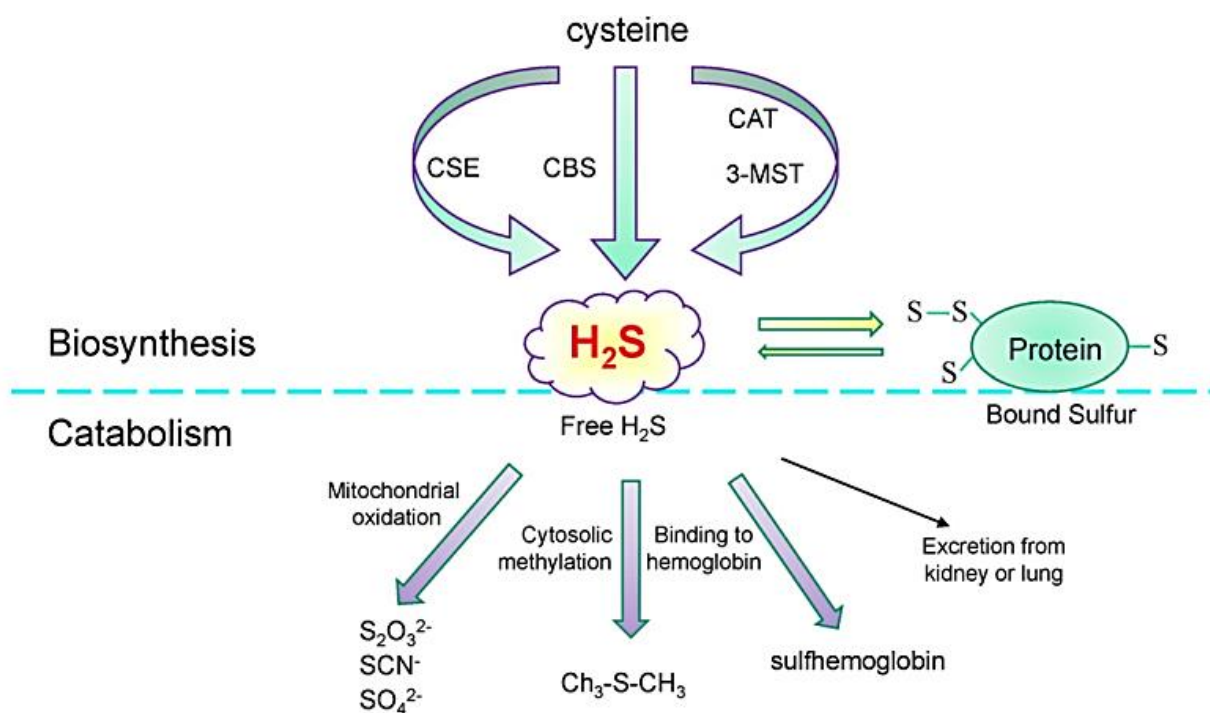
V mitochondriích dochází k rychlé oxidaci H_2S nejprve na thiosíran, který je dále přeměněn na siřičitan a síran (Obr. č. 10). Oxidace sulfanu na thiosíran probíhá pravděpodobně bez enzymatického působení - proces je spojen s mitochondriálním elektronovým respiratorním transportem. Tento proces může katalyzovat superoxid dismutáza. Přeměna thiosíranu na siřičitan je katalyzována kyanid sulfurtransferázou (TST), která přenesení síru z thiosíranu na kyanid nebo další akceptory (Picton et al. 2002). Siřičitan, který v této reakci vzniká, je rychle oxidován na síran pomocí siřičitan oxidázy. Ve fyziologických podmínkách je tudíž síran hlavním konečným produktem metabolismu sulfanu. Nicméně většina síranů v moči vzniká z oxidace cysteinu za působení cystein dioxygenázy (Obr. č. 7). Přestože je v moči také vylučován thiosíran, jeho koncentrace je zde velmi malá (Kamoun 2004). Thiosírany jsou však považovány za specifický indikátor produkce sulfanu probíhající v celém těle (Belardinelli et al. 2001).

Druhá cesta katabolismu H_2S je methylace thiol S-methyltransferázou (TSMT) na methanthiol a dimethylsulfid (Furne et al. 2001) (Obr. č. 10). Tato reakce probíhá hlavně v cytosolu. Některé studie poukazují na význam této reakce přinejmenším v gastrointestinálním traktu (Levitt et al. 1999; Picton et al. 2002).

Poslední reakce souvisí s navázáním sulfanu na methemoglobin, čímž vzniká sulfhemoglobin (Obr. č. 10). Protože hemoglobin může vázat také NO a CO, je to společné cílové místo pro všechny tři gasotransmittery (Łowicka & Bełtowski 2007). Schéma na Obr. č. 11 zobrazuje biosyntézu, uskladnění a katabolismus sulfanu.



Obr. č. 10: Katabolismus H₂S. (1) - oxidace v mitochondriích, (2) - methylace v cytosolu, (3) - navázání na hemoglobin. SO - siřičitan oxidáza, TSMT - thiol S-methyltransferáza, TST - kyanid sulfurtransferáza (Zdroj: Łowicka & Bełtowski 2007)



Obr. č. 11: Schéma syntézy, uskladnění a katabolismu endogenního sulfanu. 3 MST - 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza, CAT - cystein aminotransferáza, CBS - cystathionin β-syntáza, CSE - cystathionin γ-lyáza, S₂O₃²⁻ - thiosíran, SCN⁻ - thiokyanatan, SO₄²⁻ - síran, CH₃-S-CH₃ - dimethylsulfid (zdroj: Tan et al. 2010)

3.2.5 Mechanismy přenosu signálu

Doposud rozpoznané signální mechanismy spouštěné sulfanem jsou shrnuty v Tab. č. II. H₂S je silné redukční činidlo. V mnoha systémech je účinek sulfanu zprostředkován ATP senzitivními draslíkovými kanály (K_{ATP}). Tento úsudek je založený na základně pozorování mnoha účinků sulfanu, které jsou podobné jako účinky látek, které otevírají K_{ATP} kanály (například pinacidil, diazoxid). Tyto účinky jsou eliminovány inhibitory zmíněných látek (například glibenklamidem). Kromě těchto kanálů sulfan ovlivňuje také T-typ Ca²⁺ kanálů (Maeda et al. 2009), L-typ Ca²⁺ kanálů (Marques-da-Silva et al. 2010), TRPA1 kanály (Streng et al. 2008), velmi vodivé BK_{CA} kanály (Sitdikova et al. 2010) a mitochondriální cytochrom c oxidázu (Li & Moore 2008).

H₂S je velmi reaktivní molekula a může snadno reagovat s dalšími molekulami, například s reaktivním kyslíkem a různými formami reaktivního dusíku (ROS a RNS). Bylo dokázáno, že sulfan reaguje přinejmenším se čtyřmi různými ROS: superoxidovým volným radikálem (Mitsubishi et al. 2005), peroxidem vodíku (Geng et al. 2004a), peroxyinitrem (Whiteman et al. 2004) a chlornanem (Whiteman et al. 2005). Všechny tyto molekuly jsou vysoce reaktivní a výsledek jejich reakce se sulfanem je ochrana proteinů a lipidů proti poškození způsobenému ROS nebo RNS (Whiteman et al. 2004; Whiteman et al. 2005). Význam reakce H₂S s O₂⁻ je nejednoznačný, protože její produkt - siřičitan - má jak toxické (Collin & Thiernemann 2005), tak antioxidační (Mitsubishi et al. 2001) účinky v závislosti na jeho koncentraci. Sulfan také reaguje s NO za vzniku nitrosothiolových sloučenin s dosud nepopsanou chemickou strukturou (Whiteman et al. 2006). Zajímavé je, že na rozdíl od dalších nitrosothiolů (R-S-NO), které jsou považované za zdroj NO a často napodobují jeho účinky, nitrosothiol pocházející z H₂S a NO je inaktivní. Je možné, že sulfan možná čistí tělo od přebytků NO, které jsou produkovány během zánětu (Whiteman et al. 2006). Také ale může limitovat dostupnost nepřetržitě vznikajícího NO (Ali et al. 2006).

Doplňkový mechanismus, během kterého se uplatňují antioxidační účinky sulfanu, zahrnuje stimulaci transportu cysteinu do buněk a zvýšení syntézy glutathionu (Kimura & Kimura 2004). Navíc bylo dokázáno, že sulfan stimuluje expresi hemoxygenázy a produkci CO (Łowicka & Bełtowski 2007). Sulfan ovlivňuje také další enzymy - například extracelulární signál-regulační kinázu (ERK) a indukovatelnou NO syntázu (iNOS) (Tab.č. II).

Není však jasné, jestli jsou tyto účinky prvotní nebo vyplývají ze stimulace dalších buněčných cílů jako například K_{APT} kanálů.

Sulfan má velký účinek také na buňky hladkých svalů, zánětové buňky, endoteliální buňky, na faktory uplatňující se při transkripci v jádře buněk, v endoplasmatickém retikulu či v mitochondriích (Du et al. 2004; Sivarajah et al. 2009; Polhemus & Lefer 2014). Jedním z účinků sulfanu je vliv na homeostázu cév a vasorelaxaci jejich stěn (Wang 2002). Sulfan také mění aktivitu a expresi proteinů zapojených do apoptózy, angiogeneze, proliferace, metabolismu, při diabetes nebo oxidativním stresu (Faro et al. 2014; Yu et al. 2014). Hong et al. (2014) ve svých výzkumech prokázal, že H_2S podporuje v těle člověka proliferaci a migraci nádorových buněk SW 480 v tračníku. Zvýšení intratumorové syntézy sulfanu u kolorektálních a ovariálních nádorů enzymem CBS podporuje buněčnou bioenergetiku, proliferaci a migraci nádorových buněk (Hellmich et al. 2014). H_2S také aktivuje jaderné faktory fibroblastů v dásních, což může vést z rozvoji paradontózy (Chi et al. 2014). Protektivní účinky sulfanu zahrnují inhibici vaskulární proliferace a migrace, regulaci krevního tlaku a cévního tonu, prevenci agregace krevních destiček či adhezi leukocytů, podporují proliferaci endotelových buněk, redukuje oxidativní stress a také působí proti oxidaci LDL a tvorbě pěnitých buněk (foam cell syndrom) (Ali et al. 2006; Ondrias et al. 2008; Whiteman & Moore 2009; Bertova et al. 2010; Tomaskova et al. 2011).

Tab. č. II: Nitrobuněčné signální mechanismy způsobené sulfanem

Signální mechanismus	Zdroj
Stimulace K_{ATP} kanálů v:	
• krevních cévách	(Cheng et al. 2004)
• myokardu	(Geng et al. 2004b)
• β -buňkách pankreatu	(Yang et al. 2005)
• neuronech	(Kimura et al. 2006)
• karotickém sinu	(Xiao et al. 2006)
• hladkých svalech tračníku	(Distrutti et al. 2006)
Udržování proteinových -SH skupin v redukované formě	(Abe & Kimura 1996)
Stimulace adenylát cyklázy	(Kimura 2000; Lee et al. 2006)
Reakce s ROS a RNS:	
• O_2^-	(Mitsubishi et al. 2005)
• H_2O_2	(Geng et al. 2004a)
• $ONOO^-$	(Whiteman et al. 2004)
• ClO^-	(Whiteman et al. 2005)
• NO	(Ali et al. 2006)
Stimulace transportu cysteinu do buněk a GSH syntéza	(Kimura & Kimura 2004)
Stimulace ERK	(Oh et al. 2006)
Inhibice ERK	(Du et al. 2004)
Stimulace HO-CO cesty	(Oh et al. 2006)
Stimulace iNOS	(Jeong et al. 2006)
Inhibice iNOS	(Oh et al. 2006)
Zvýšení intracelulárního Ca^{2+}	(Nagai et al. 2004)
Stimulace TRPV1 kanálu	(Patacchini et al. 2005)

(zdroj: Łowicka & Beltowski 2007)

3.2.6 Sulfan produkující enzymy

V samčích buňkách je endogenní sulfan produkován čtyřmi enzymy: cystathionin γ -lyázou (CSE), cystathionin β -syntázou (CBS), cystein aminotransferázou (CAT) a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázou (3 MST) (Hughes et al. 2009; Tanizawa 2011; Wang 2012; Hancock & Whiteman 2014; Olas 2014; Xu et al. 2014). CBS je hlavní sulfan produkující enzym v centrálním nervovém systému a CSE je přítomný především v cévách, játrech a ledvinách. Oba enzymy však k tvorbě sulfanu využívají aminokyseliny L-cystein (který je syntetizován z L-methioninu transsulfurací), L-homocystein a L-cystathionin a dále pyridoxal-5'-fosfát (vitamin B₆) jako kofaktor reakce (Lefer 2007; Ishigami et al. 2009; Shibuya et al. 2009a; Shibuya et al. 2009b; Wang 2012; Yang et al. 2013; Xu et al. 2014). Vznik sulfanu působením těchto enzymů je shrnut na Obr. č. 12.

CBS je produkován v játrech, ledvinách, mozku (především v Bergmannových buňkách a v astrocytech), ileu, děloze, placentě a v pankreatických buňkách (Enokido et al. 2005; Ichinohe et al. 2005). Koncentrace CBS v mozku závisí na věku jednotlivce. Bylo dokázáno, že v mozku embrya jsou hodnoty CBS nízké a produkce enzymu probíhá především v neuroepiteliálních buňkách mozkových komor. Avšak již v pozdním prenatálním období a následně v neonatální periodě se jeho koncentrace velmi zvýší a produkce CBS probíhá především v radiálních gliových buňkách a astrocytech. U dospělých jedinců hodnoty enzymu klesají (Enokido et al. 2005; Kimura 2013). Produkce CBS v astrocytech může být podpořena, epidermálním růstovým faktorem (EGF), transformačním růstovým faktorem α (TGF- α) a cyklickým adenosin monofosfátem (cAMP) a také dexametazonem (Abe & Kimura 1996).

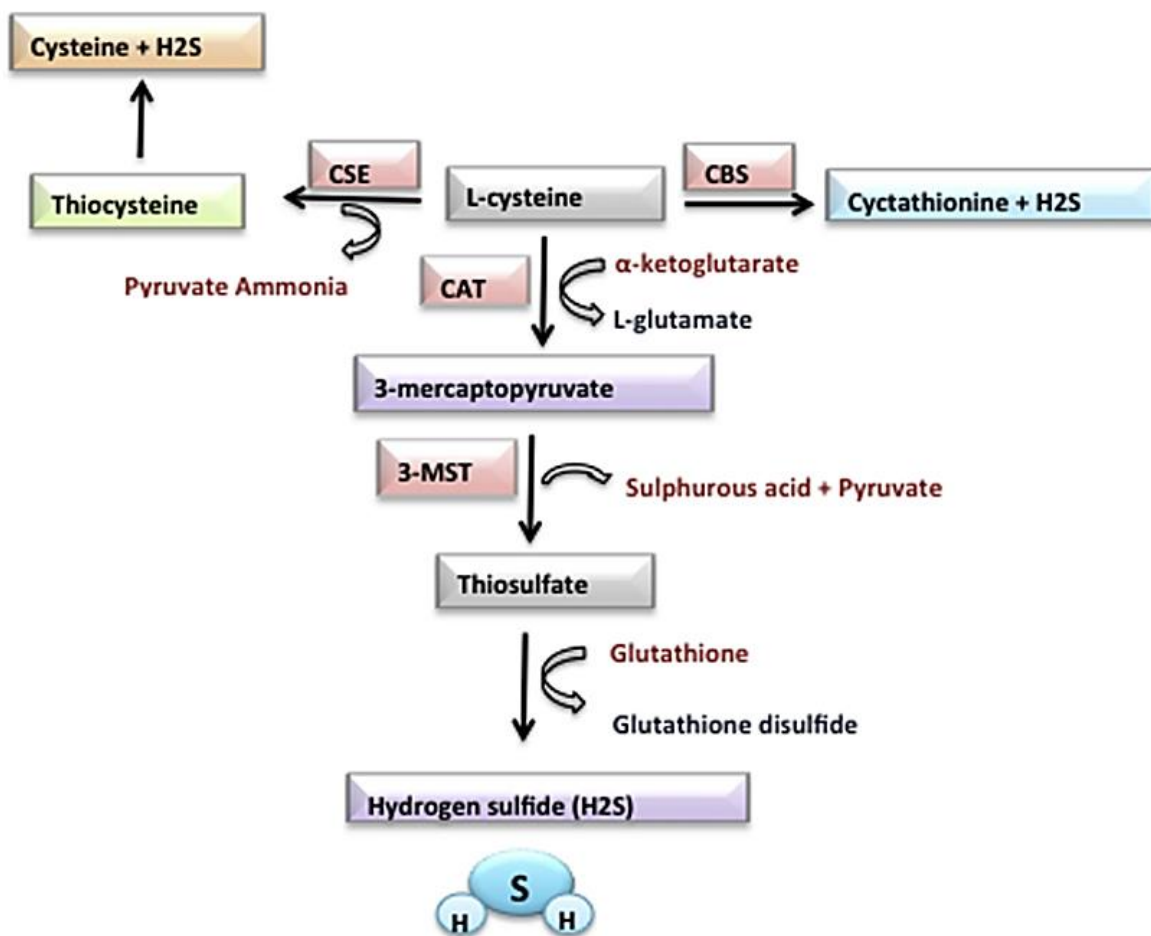
Bylo zjištěno, že i v hipokampu a v mozečku se CBS produkuje. V experimentech bylo zpozorováno, že mozkové homogenáty produkovaly sulfan, pokud byl přítomný cystein a pyridoxal-5'-fosfát. Pokud došlo k inhibici CBS hydroxylaminem či amino-oxyacetátem, vedlo to ke snížení produkce H₂S. Pokud však byl přítomný aktivátor tohoto sulfan produkujícího enzymu (například S-adenosyl-L-methionin), byla produkce endogenního sulfanu větší (Abe & Kimura 1996). Sulfan má právě v hipokampu důležitou roli. Přestože jeho vysoké koncentrace potlačují synaptické odpovědi, fyziologické koncentrace H₂S usnadňují vznik dlouhotrvající potenciace v hipokampu (Abe & Kimura 1996). Sulfan je tudíž považován za jeden z mozkových neuromodulátorů. Vývoj mozku, a tím pádem i produkce

CBS, je spojen s původem jedince a s jeho genetickými předky (Enokido et al. 2005; Kimura 2013). Na vyšší produkci CBS mají také vliv reaktivní astrocyty (Kimura 2013).

V mozku zvyšují aktivitu CBS také například elektrické stimuly, excitační neurotransmitery, mezi které můžeme zařadit receptory glutamátu, jako jsou N-methyl-D-aspartát (NMDA) a α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionát (AMPA). Meziproduktem metabolismu methioninu a zároveň hlavním donorem methylových skupin je S-adenosyl-methionin (SAM) (Obr. č. 6), který patří mezi allosterické aktivátory CBS (Ogasawara et al. 2002). Zdá se, že i pohlavní hormony mají vliv na regulaci sulfanu v mozku, protože aktivita CBS a úroveň sulfanu v experimentech byly vyšší u myších samců než u myších samic. Navíc kastrace samců myší vedla ke snížení produkce sulfanu (Ogasawara et al. 2002). Také nitroprusid sodný, donor oxidu dusnatého, zvyšuje *in vitro* aktivitu CBS v mozku. Naopak samotný NO se může vázat a inaktivovat CBS. Zajímavé je, že CO je mnohem účinnější inhibitor CBS než NO. Proto je zvažována možnost, že CBS by mohl být jedním z molekulárních cílů pro CO v mozku (Taoka & Banerjee 2001; Puranik et al. 2006).

CSE produkuje sulfan z cysteinu nebo homocysteinu. Za běžných podmínek však 70 % H_2S vzniká z cysteinu a zbylých 30 % právě z homocysteinu. Pokud ale dojde ke zvýšení koncentrace homocysteinu (například při homocysteinémii), je homocystein preferovaným zdrojem pro vznik sulfanu (Chiku et al. 2009). CSE je produkován v játrech, ledvinách, aortě, ileu, vrátnicové žíle, děloze, mozku, také v pankreatických buňkách a v placentě (Hosoki et al. 1997; Kaneko et al. 2006; Vitvitsky et al. 2006; Diwakar & Ravindranath 2007; Patel et al. 2009). Ke zvýšení exprese CSE může dojít za přítomnosti donorů NO, jako je S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP), či nitroprusid sodný (Zhao et al. 2001), nicméně účinky NO na CSE jsou stále diskutabilní (Chiku et al. 2009). Také bylo zjištěno, že koncentrace CSE může být regulována vápníkem/kalmodulinem (Yang et al. 2008).

3 MST společně s CAT dokáží produkovat sulfan z cysteinu za přítomnosti α -ketoglutarátu (Cooper 1983; Kuo & Stipanuk 1983; Frendo & Wróbel 1997). 3 MST je přítomný v játrech, ledvinách, srdci, plicích, brzlíku, varlatech, aortě a v mozku (Ogasawara & Tanabe 1994; Shibuya et al. 2009a; Shibuya et al. 2009b). Produkce sulfanu katalyzována 3 MST a CAT z cysteinu a α -ketoglutarátu je tlumena kvůli konkurenci s aspartátem, což je preferovaný substrát pro CAT (Kimura 2011).



Obr. č. 12: Možné cesty biosyntézy sulfanu pomocí sulfan produkujících enzymů. H₂S - sulfan, CBS - cystathionin β-syntáza, CSE - cystathionin γ-lyáza, CAT - cystein aminotransferáza, 3 MST - 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (zdroj: Gur et al. 2015)

Další studie prokázaly, že hormony jsou také důležitými faktory v regulaci CBS a CSE produkce. Yusuf et al. (2005) popsal, že u kryš léčba inzulinem značně snížila biosyntézu sulfanu ve slinivce břišní a v játrech. Tento jev doprovázelo také snížení mRNA exprese CBS a CSE (Yusuf et al. 2005). Další studie potvrdily, že inzulín snižuje produkci a aktivitu CBS a CSE v játrech, zatímco glukagon nebo glukokortikoidy mají na CBS a CSE opačný efekt (Jacobs et al. 1998; Dicker-Brown et al. 2001; Jacobs et al. 2001; Ratnam et al. 2002; Schalinske 2003). Zhu et al. (2010) prokázal, že dexametazon tlumí biosyntézu sulfanu a CSE expresi vyvolanou lipopolysacharidy. Bucci et al. (2009) tvrdí, že testosteron v chlopních aorty silně podporuje produkci H₂S a zvyšuje aktivitu CSE u kryš.

3.2.7 Funkce sulfanu v reprodukční soustavě

Produkce sulfanu probíhá takřka ve všech tkáních v těle, proto se předpokládá, že má nějaký význam i v reprodukčním systému, ačkoliv se dříve myslelo, že má H₂S v reprodukčním traktu pouze toxické účinky, a to u obou pohlaví. Nicméně produkce sulfanu sulfan produkujícími enzymy a endogenní produkce H₂S byla popsána jak v samčím, tak v samičím reprodukčním traktu u mnoha savců (Sugiura et al. 2005; Liang et al. 2006; d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2009; Patel et al. 2009; Srilatha et al. 2009). Tkáň penisu produkuje jak CSE, tak CBS (ten v trochu menší míře) (Huang et al. 2012). CSE je lokalizován hlavně v Sertoliho buňkách a v nedozrálých spermiiích (například ve spermatogonii), zatímco CBS je produkován v Leydigových a Sertoliho buňkách a také v zárodečných buňkách, z čehož plyne, že sulfan má nějakou funkci i ve varlatech (Oi et al. 2001). Tkáňové homogenáty varlat dokázaly aktivně přeměnit L-cystein na H₂S (d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2009; Ghasemi et al. 2012). Také v hladkém svalstvu cév penisu byly na základě imunoreaktivity detekovány enzymy CSE i CBS (d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2011). Imunoreaktivita pro CSE byla pozorována v hladkosvalových buňkách kapilár penisu, v tepně penisu i v periferních nervech (d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2011). CBS je produkován hlavně v trabekulární svalové tkáni (Zhu et al. 2011). V experimentu, kde se pracovalo s homogenáty krysích tkání kavernózního tělesa (CC, z lat. *corpus cavernosum*), bylo detekováno určité množství H₂S, které se až 3,5x zvýšilo po inkubaci s L-cysteinem, což je substrát pro CBS/CSE (d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2009). Ve srovnání s jinými orgány byla produkce sulfanu v CC výrazně větší. V lidské tkáni CC inhibitory CSE nebo CBS značně snížily produkci sulfanu jak enzymem CBS, tak CSE (d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2009). Určité koncentrace CSE i CBS byly nalezeny také ve varlatech potkanů (Sugiura et al. 2005).

Dále byly účinky sulfanu zkoumány v souvislosti s erektilní dysfunkcí (ED). Pro vyvolání a udržení erekce je nezbytné, aby panovala rovnováha mezi vasodilatačními a vasokonstričními mechanismy. Lokálně je relaxace CC řízena neurogenním mechanismem, který je zprostředkovaný NO-cyklickým guanosine monofosfátovým (cGMP) mechanismem (Ignarro et al. 1990; Burnett et al. 1992; Toda et al. 2005; Feifer & Carrier 2008). Neuromodulační účinek sulfanu na vaskulární CC zatím není zcela objasněn, nicméně různé studie poukazují na nežádoucí signály mezi NO a H₂S (Zhao & Wang 2002; Kubo et al. 2007), které by měly být předmětem dalších výzkumů. Sulfan může působit jako mediátor v lidském

CC a přímo ovlivňovat právě erektilní dysfunkci (d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2009). Usnadnění erektilní funkce bylo již dříve popsáno u králíků, krys a primátů (Srilatha et al. 2006; Srilatha et al. 2007; d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2009). Bylo prokázáno, že proerektilní relaxační účinky H_2S jsou závislé na koncentraci této molekuly (Srilatha et al. 2007). Endogenní produkce sulfanu také zvýšila vasorelaxační účinek nitroprusidu sodného (donoru NO) (Zhao et al. 2001). Podávání exogenního sulfanu zvýšilo eNOS (endotelová NO-syntáza) a biologickou dostupnost NO (Kondo et al. 2013; Polhemus et al. 2013). Sulfan může také částečně ovlivnit výslednou kavernózní relaxaci hladkého svalstva a erekci penisu. Ještě se však neví, jaký vliv má kooperace či kompetice H_2S a NO, přestože oba současně v erektilní tkáni interagují s proteiny v S-sulfhydrataci a v S-nitrosylaci (Gur et al. 2015).

Varlata a spermie jsou poměrně náchylné na zánět a oxidativní stres. Přestože už dříve bylo známo, že má sulfan důležitou funkci při zánětlivém procesu a oxidativním stresu jakožto signální molekula, o jeho roli v reprodukčním systému se však toho ví méně. V poslední době ale existují studie, které se vlivem sulfanu na reprodukční systém zabývají. Wang et al. (2018) pracoval se skupinou subfertilních a infertilních jedinců, kteří byli převážně astenospermičtí. U obou skupin byla zpozorována snížená koncentrace H_2S v semenné plazmě a také utlumená exprese CBS ve spermiích. Pokud se do spermatu dodal exogenní sulfan, zvýšila se pohyblivost spermií u astenospermatických jedinců. Snížená pohyblivost spermií byla také pozorována u zvířecích modelů, u kterých docházelo k chybné expresi sulfanu (například u diabetických myší, či u myší s deficitem CBS). Jejich výzkum také poukázal na to, že pokud dojde ke snížení endogenní produkce sulfanu a CBS vlivem stresu, může dojít k poškození spermatogeneze a hematotestikulární bariéry. Dodávání exogenního sulfanu nebo nadprodukce CBS může zmírnit selhávání spermatogeneze. Vliv H_2S je dán hlavně prostřednictvím svých protizánětlivých a antioxidačních účinků (Wang et al. 2018). Výsledky těchto vědců poukazují na to, že H_2S je důležitý pro udržení mužské fertility a pro ochranu funkce varlat.

Další zkoumanou strukturou samčího pohlavního ústrojí z hlediska sulfanu je prostata. Bylo pozorováno, že stroma prostaty a jeho buňky vykazují střední až vysoké hodnoty CSE, naproti tomu v periferní části prostaty byly CBS a CSE těžko detekovány (Guo et al. 2012). Gai et al. (2013) dále prokázali, že ve tkáni prostaty se kromě CBS a CSE vyskytuje také 3 MPST a že CSE je produkován mnohem více než druhé dva enzymy. Pokud došlo k zamezení

produkce CSE, byla produkce sulfanu ve tkáni prostaty o 80 % nižší, což znamená, že hlavním sulfan produkujícím enzymem prostaty je CSE (Liu et al. 2016). Z výsledků experimentů vyplývá, že sulfan působí proti růstu rakovinných buněk ve tkáni prostaty (Zhao et al. 2014; Duan et al. 2015).

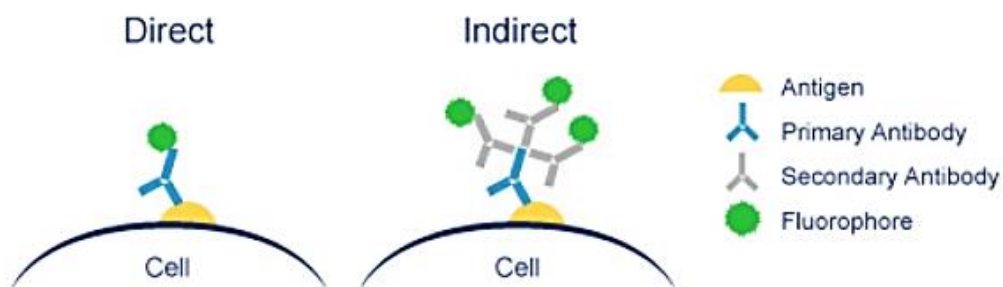
Některé studie dokazují, že CSE a CBS hrají v samičí reprodukci různé role. V experimentech bylo dokázáno, že přítomnost enzymů souvisí s lepší plodností samic (Watanabe et al. 1995). CBS je všudypřítomně distribuován ve vaječnicích, jeho nejsilnější produkce je ve folikulárních buňkách ve všech stádiích, není však produkován v oocytech (Liang et al. 2006). Produkce enzymů také souvisí s estrálním cyklem samic, hmotností dělohy, s procentem přežívajících plodů (Guzmán et al. 2006). Expresce CBS má vliv i na dozrávání oocytů (Liang et al. 2007). CBS i CSE byly rovněž detekovány v reprodukčním traktu a v gestační tkáni, což zahrnuje tkáň dělohy, pochvy, placenty a plodových obalů (Patel et al. 2009; Srilatha et al. 2009). Výzkumy v minulých letech prokázaly, že sulfan má relaxační účinky na samičí reprodukční trakt, čímž oddaluje porod (Hayden et al. 1989; Sidhu et al. 2001; Srilatha et al. 2009).

3.3 Imunocytochemická metoda

Úkolem experimentů bylo dokázání přítomnosti CBS v kančích spermích. Podstatou experimentu byla imunocytochemická metoda, kdy součástí sekundární protilátky byla fluorescenční barva, která navázáním na primární protilátku označila nalezený antigen, v našem případě CBS.

Imunocytochemické metody používají protilátky k detekci antigenu v buňkách. Principem metody je fixace proteinu (neboli antigenu) v buňkách, navázání specifické protilátky na antigen a následně vizualizace protilátky (Bartůňková & Paulík 2005). Primární protilátky se obvykle získávají na myších nebo králících - v našem případě byla použita primární protilátka získaná na králících. Produkce protilátek v laboratorních zvířatech spočívá ve vpravení antigenu do pokusného zvířete. Po opakovaném vpravení dojde ke stimulaci B-lymfocytů a k tvorbě protilátek, které se uvolní do krevního oběhu. Dochází ke stimulaci různých klonů B-lymfocytů, protože určitý antigen má různé epitopy. Takto vzniklé protilátky se nazývají polyklonální (Hořejší & Bartůňková 2009), tento typ protilátek byl použit i v našem experimentu. Po úspěšné imunizaci se zvířeti odebere sérum obsahující tyto primární

protilátky. Primární protilátka se váže na antigen a zbytek protilátky je následně odstraněn puřem (v našich experimentech bylo k tomuto účelu použito PBS). Sekundární protilátka je získána rovněž na některém živočišném druhu, v našem případě na kozách. Reaguje proti imunoglobulinu tvůrce primární protilátky, sekundární protilátka použita v našem experimentu byla tedy kozí proti králičímu imunoglobulinu. Sekundární protilátka se váže na primární protilátku v místě, kde se primární protilátka navázala na antigen, a je značena (v našem případě fluorescenčním barvivem), takže místo reakce lze pozorovat na mikroskopu. Tato metoda se nazývá nepřímá, pokud by byla označena primární protilátka, jednalo by se o metodu přímou (Bartůňková & Paulík 2005) (Obr. č. 13). Sekundární protilátka je následně také smyta puřem. Ke značení protilátek se kromě fluorescenčního barviva využívá enzymů (například enzym alkalické fosfatázy), nebo koloidní zlato. Pokud se jedná o značení fluorescenčním barvivem, fluorofory jsou po ozáření světlem schopny absorbovat světlo určité vlnové délky a následně vyzařovat světlo o delší vlnové délce. Mezi fluorescenční barviva patří například cyanin, DAPI či zelený fluorescenční protein (GFP), v našich experimentech byla sekundární protilátka konjugována s fluorescenčním barvivem Alexa 488. Během této metody může dojít k vazbě primární protilátky k jiným bílkovinám a ke vzniku tzv. nescifických vazeb, z toho důvodu je nutno tyto nescifická vazebná místa vysytit. V našich experimentech byl k tomuto účelu použit Super Block. Také sekundární protilátka se může vázat na nescifické vazby, z tohoto důvodu se využívá kontrolních vzorků, na které není aplikována primární protilátka, tudíž by nemělo dojít k navázání sekundární protilátky a svícení fluorescenčního barviva v mikroskopu. Pokud kontrolní vzorky svítí, došlo k navázání sekundární protilátky na nescifické vazby (Alberts 1998; Campbell & Reece 2006).



Obr. č. 13: Přímá a nepřímá metoda imunocytochemie (zdroj: Alberts 1998)

4 Materiál a metody

4.1 Použité protilátky

V experimentu byla použita polyklonální protilátka proti enzymu CBS (ThermoFisher Scientific, USA). V Tab. č. III jsou uvedeny jednotlivé parametry této protilátky.

Tab. č. III: Parametry použité primární protilátky

Primární protilátka anti-CBS	
Detaily produktu	
Objem	100 μ l
Hostitelský organismus	Králík
Kategorie	Polyklonální
Imunogen	KLH konjugovaný syntetický peptid v oblasti mezi 104.–133. aminokyselinou Z N-koncové oblasti lidského CBS
Forma	Kapalina
Koncentrace	0,5 mg/mL
Purifikace	Protein A
Skladovací pufr	PBS
Obsahuje	0,09% azid sodný
Podmínky skladování	- 20 °C, vyhněte se cyklům zmrazení/rozmrazení
Reaktivní druhy	
Testované reaktivní druhy	Člověk, myš
Aplikace a ředění	
Western Blot (WB)	1 : 1000
Imunofluorescence (IF)	1 : 10–1 : 50
Imunocytochemie (ICC)	1 : 10–1 : 50
Imunohistochemie (Parrafin) (IHC (P))	1 : 50–1 : 100
Průtoková cytometrie (Flow)	1 : 10–1 : 50

(zdroj: ThermoFisher Scientific, USA)

Jako sekundární protilátka byla v pokusech použita kozí polyklonální sekundární protilátka proti králičímu imunoglobulinu (anti-rabbit) konjugovaná s Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, USA). Podrobné parametry jsou uvedeny v Tab. č. IV.

Tab. č. IV: Parametry použité sekundární protilátky

Sekundární protilátka - polyklonální kozí anti-rabbit + Alexa Fluor 488	
Detaily produktu	
Objem	500 µl
Hostitelský organismus	Koza
Imunogen	Těžké a lehké řetězce IgG
Konjugát	Alexa Fluor 488
Forma	Kapalina
Koncentrace	2 mg/mL
Purifikace	provedena
Skladovací pufr	PBS, pH 7,5
Obsahuje	5 mM azidu sodného
Podmínky skladování	- 4 °C, skladovat ve tmě
Reaktivní druhy	
Testované reaktivní druhy	Králík
Aplikace a ředění	
Průtoková cytometrie (Flow)	1–10 µg/mL
Imunofluorescence (IF)	4 µg/mL
Imunocytochemie (ICC)	4 µg/mL

(zdroj: ThermoFisher Scientific, USA)

4.2 Příprava vzorků

Spermie kanců byly získány z komerčních inseminačních dávek z Chovné stanice PROAGRO NYMBURK a.s. od kanců plemene Landrace linie 9120. Tyto dávky obsahovaly komerční ředidlo SUS. Motilita spermií byla 85 %, dávka 80–100 ml a koncentrace spermií/ml byla 5×10^7 . Spermie byly uchovávány při teplotě 17 °C. Ihned po dovezení dávek byly odebrány vzorky spermií a ty byly inkubovány v kapacitačním médiu TL-HEPES-PVA. Spermie byly

rozděleny do skupin a kapacitovány v kapacitačním médiu po dobu 30 minut, 60 minut, 90 minut, 120 minut. Spermie byly kapacitovány v nesuplementovaném médiu (kontrolní skupina), v médiu s přidavkem donoru sulfanu (dichloromethane complex, SIGMA-ALDRICH s.r.o, USA; 150 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; experimentální skupina) a v médiu s přidavkem samotného DMSO, který byl použit jako rozpouštědlo při ředění donoru sulfanu (druhá kontrolní skupina). Kromě toho byly připraveny vzorky ejakulovaných spermií. Přehled vzorků je znázorněn v Tab. č. V. Po kapacitaci byly spermie použity pro přípravu preparátů pro průkaz CBS.

Tab. č. V: Různé varianty vzorků použité v experimentech

Vzorky	Doba kapacitace	Obsažená látka
Ejakulované	-	-
Kapacitované	30 min	-
	30 min	Donor H ₂ S
	30 min	DMSO
	60 min	-
	60 min	Donor H ₂ S
	60 min	DMSO
	90 min	-
	90 min	Donor H ₂ S
	90 min	DMSO
	120 min	-
	120 min	Donor H ₂ S
	120 min	DMSO

Vzorky byly dvakrát omyty ve fosfátovém pufru (PBS; Alpha Laboratories Ltd., Velká Británie) a supernatant byl odsán. Na podložní sklíčko bylo nanášeno 20 μl suspenze spermií v PBS a 50 μl vymraženého aceton : methanolu (LACH-NER s.r.o, Neratovice) v poměru 1 : 1. Z každého vzorku bylo připraveno 5 sklíček. Po fixaci byly vzorky uchovávány při teplotě 4 °C.

4.3 Imunocytochemické stanovení CBS

Vzorky byly opláchnuty v PBS a ponořeny do kyvety s vymraženým acetonem na dobu 10 minut. Po desetiminutové inkubaci v acetonu byly vzorky opět opláchnuty v PBS a následně bylo na kontrolní i pokusné vzorky nanášeno 150 μ l Super Blocku (ThermoFisher Scientific, USA), aby došlo k vyblokování nespecifických vazeb. Všechny vzorky byly následně inkubovány v uzavřené vlhké komůrce po dobu 30 minut. Poté byly vzorky opláchnuty v PBS a inkubovány s primární protilátkou anti-CBS ředěnou v poměru 1 : 50 s PBS (75 μ l). Primární protilátka byla před použitím uchovávána v mrazáku. Inkubace probíhala přes noc při teplotě 4 °C.

Poté byly vzorky opláchnuty v PBS a inkubovány se sekundární protilátkou konjugovanou s Alexa Fluor 488. Protilátka byla ředěna s PBS v poměru 1 : 300. Na vzorky bylo nanášeno 75 μ l protilátky a inkubace probíhala ve tmě při pokojové teplotě 60 minut ve vlhké komůrce. Po skončení inkubace byly vzorky opláchnuty v PBS a montovány do montovacího média Vectashieldu s DAPI (Vector Laboratories, USA).

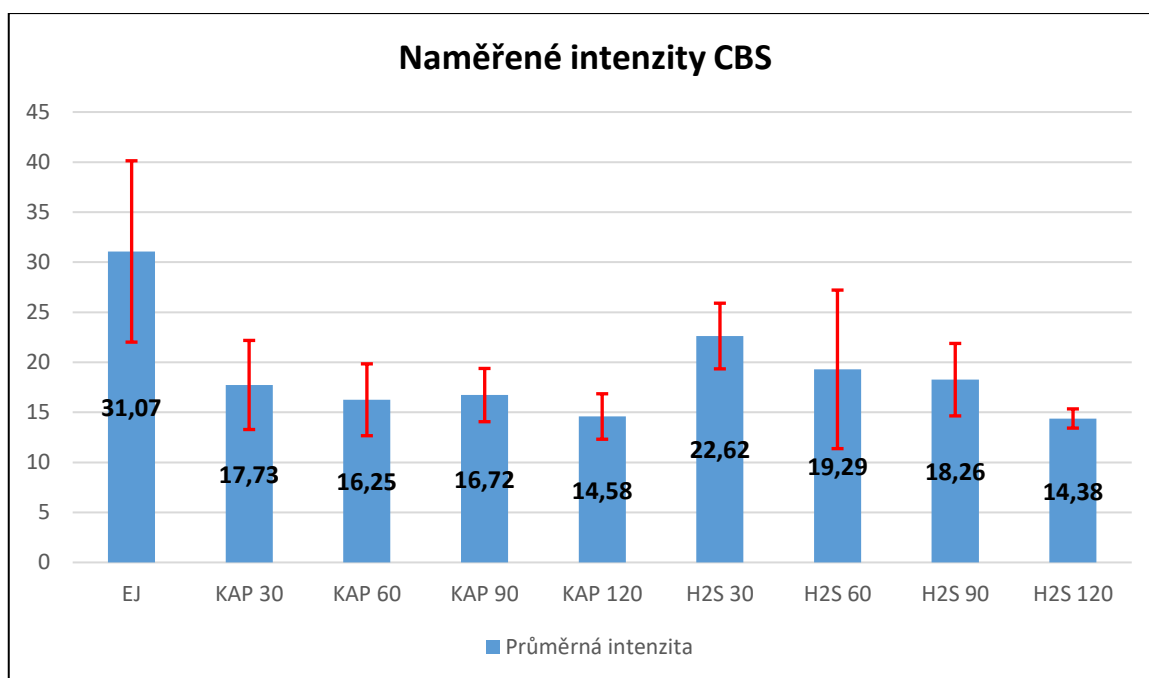
Vzorky byly snímány na konfokálním mikroskopu (Zeiss LSM 800, Německo) při zvětšení 630x a intenzita signálu byla měřena analýzou obrazu NIS-Elements AR 4.30.01 64-bit (Nikon, Japonsko).

4.4 Statistické vyhodnocení

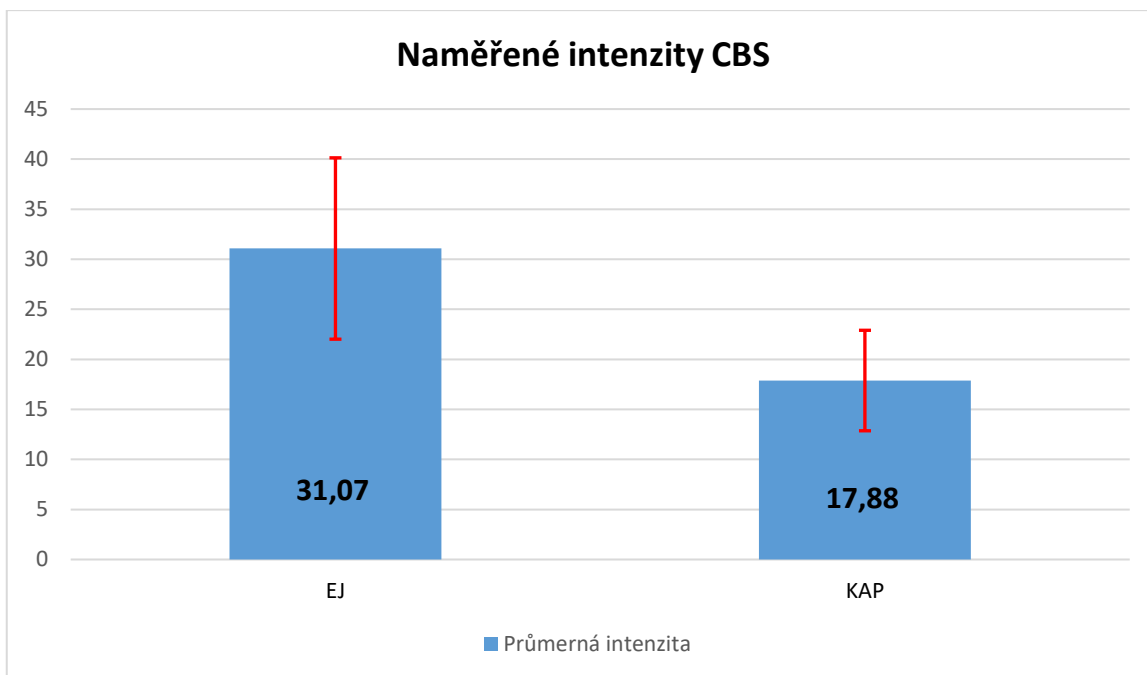
Experiment byl třikrát zopakován. Z naměřených hodnot průměrné intenzity signálu pro každou spermii byly stanoveny průměry a směrodatné odchylky pro každou pokusnou skupinu. Rozdíly mezi skupinami byly porovnány dvouvýběrovým t-testem (Microsoft Excel) při hladině statistické významnosti $p < 0,05$.

5 Výsledky

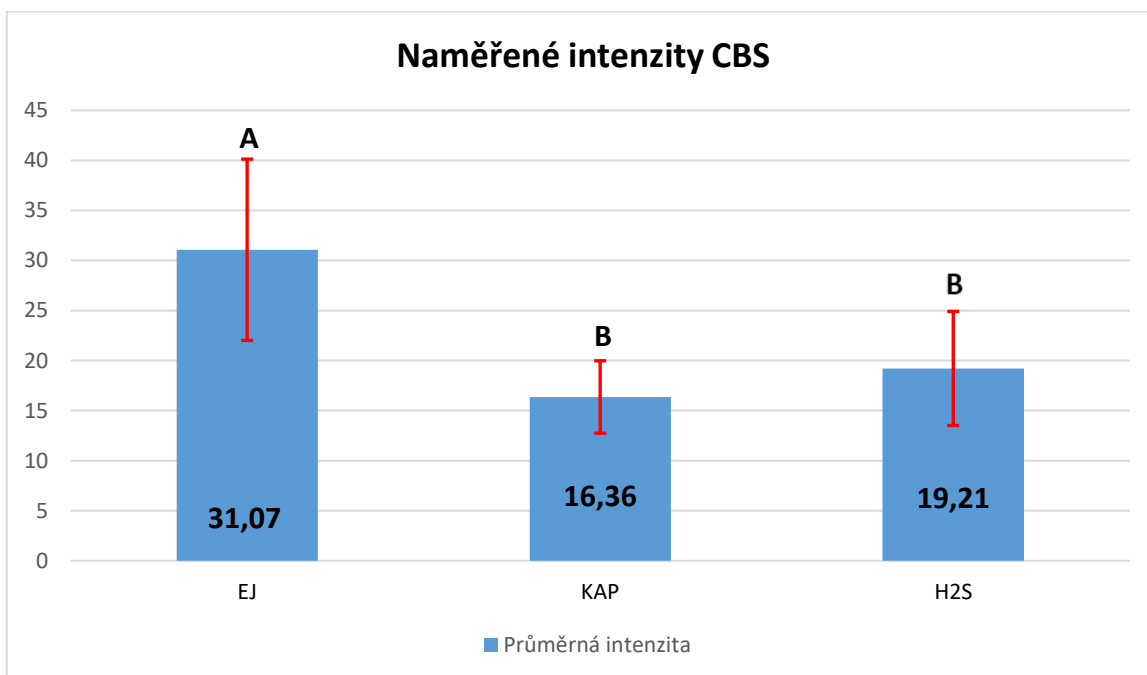
Sulfan produkující enzym cystathionin- β -syntáza (CBS) byl v kančích spermích sledován imunocytochemickou metodou. Přítomnost enzymu byla prokázána jak v ejakulovaných, tak v kapacitovaných spermích. Obr. č. 14 znázorňuje průměrné hodnoty intenzity CBS ve spermích spolu se směrodatnými odchylkami získané pomocí analýzy obrazu. Z výsledků je patrné, že největší průměrná intenzita signálu byla naměřena ve vzorcích s ejakulovanými spermii (EJ). Spermie kapacitované v kapacitačním médiu suplementovaném donorem sulfanu i v nesuplementovaném médiu dosahovaly signifikantně nižších průměrných intenzit než ejakulované spermie (Obr. č. 15). Rozdíly v průměrné intenzitě mezi oběma skupinami kapacitovaných spermíí, tedy bez donoru sulfanu a s donorem sulfanu nebyly signifikantní. Průměrná intenzita jednotlivých skupin vzorků je zobrazena na Obr. č. 16.



Obr. č. 14: Průměrná intenzita signálu CBS u ejakulovaných a kapacitovaných kančích spermíí. EJ - ejakulované spermie, KAP - kapacitované spermie, H2S - spermíí kapacitované v médiu s donorem sulfanu. Čísla u zkratk označují dobu kapacitace

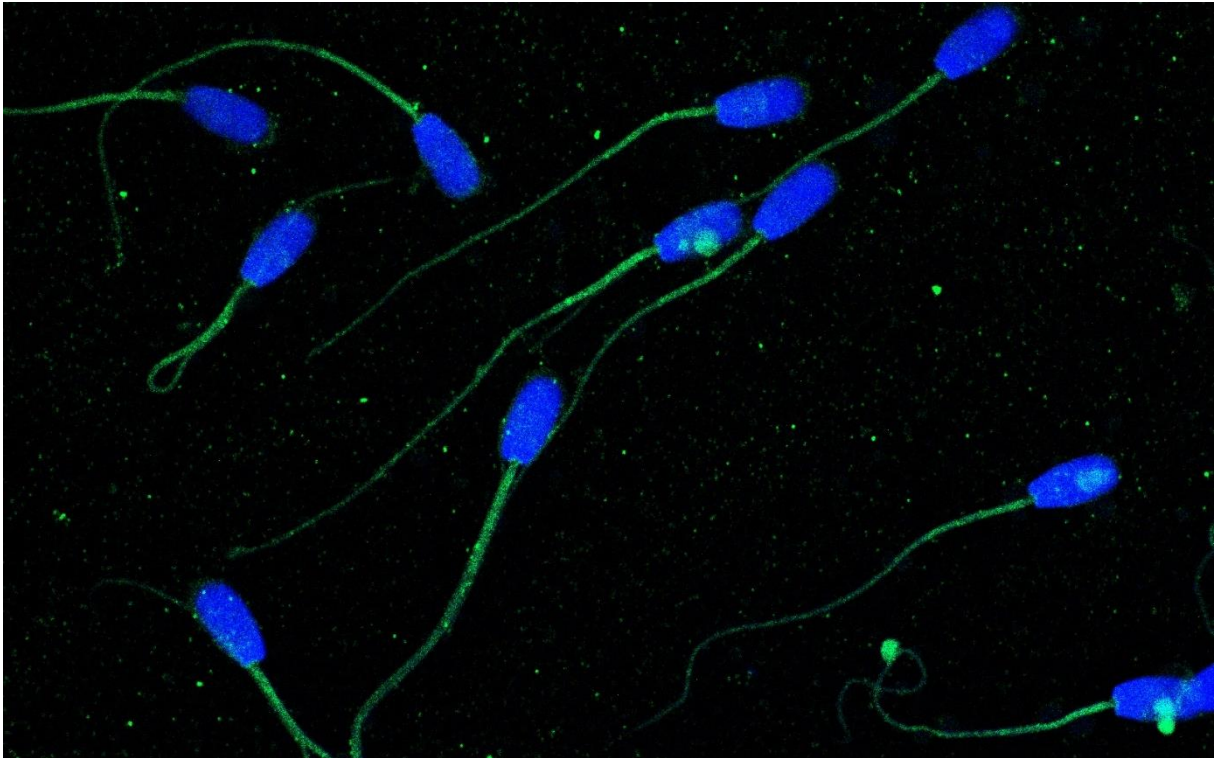


Obr. č. 15: Průměrná intenzita signálu CBS u ejakulovaných (EJ) a všech kapacitovaných (KAP) kančích spermíí. Průměrná intenzita u KAP zahrnuje všechny skupiny kapacitovaných spermíí.

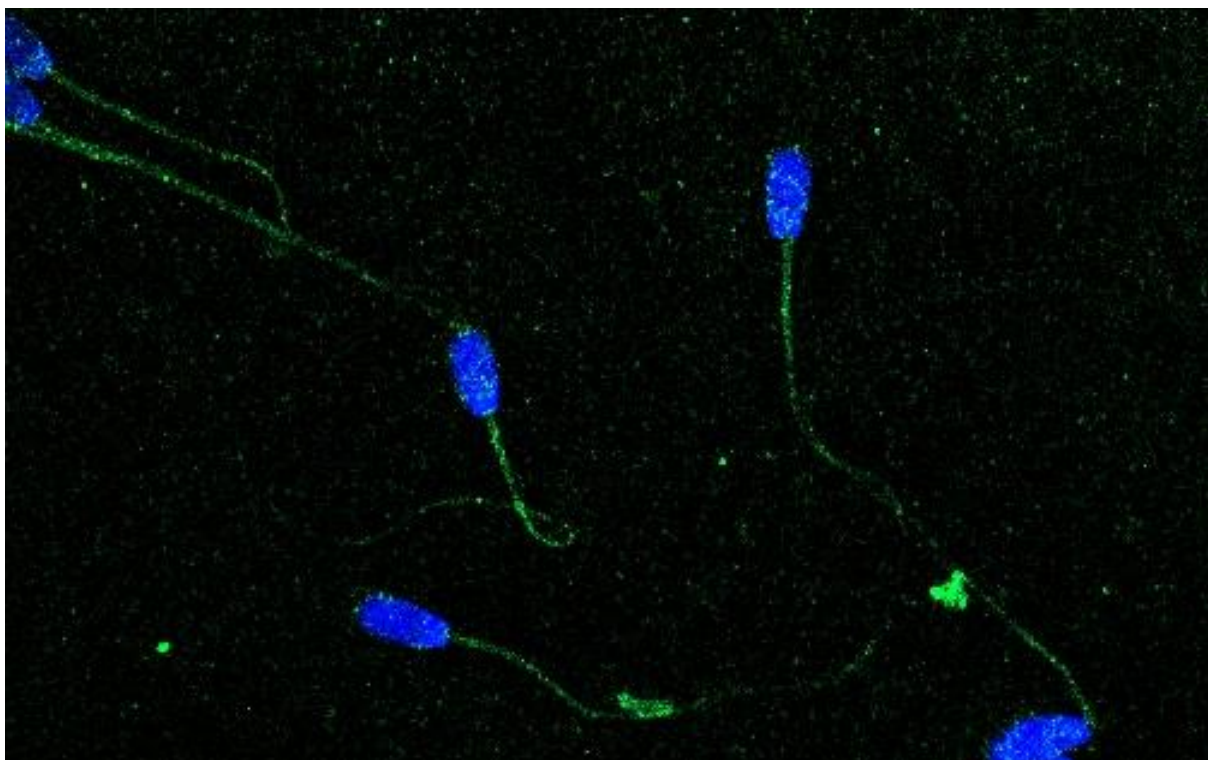


Obr. č. 16: Průměrná intenzita signálu CBS u kančích ejakulovaných spermíí (EJ), kapacitovaných spermíí (KAP) a spermíí kapacitovaných s přidavkem donoru sulfanu (H2S). A, B - staticky významné rozdíly přítomnosti CBS v jednotlivých skupinách.

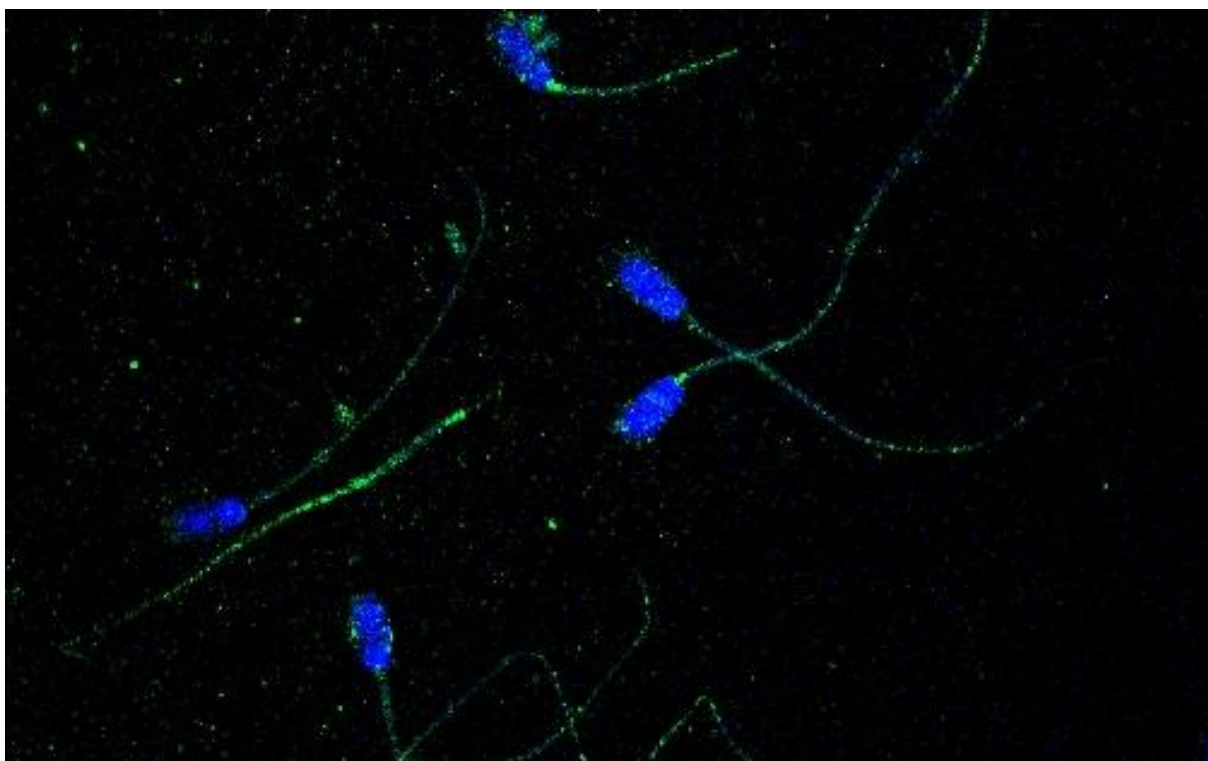
CBS byla u spermií zjištěna zejména v bičíku a s menší intenzitou také v hlavičce. Ve spermiích, které byly kapacitovány po dobu 90 a 120 minut, byly zjištěny nejnižší hodnoty intenzity signálu a tyto spermie byly z morfologického hlediska nejhorší (Obr. č. 17–25). Negativní vliv na morfologii kapacitovaných spermií měla i přítomnost donoru sulfanu (Obr. č. 22–25).



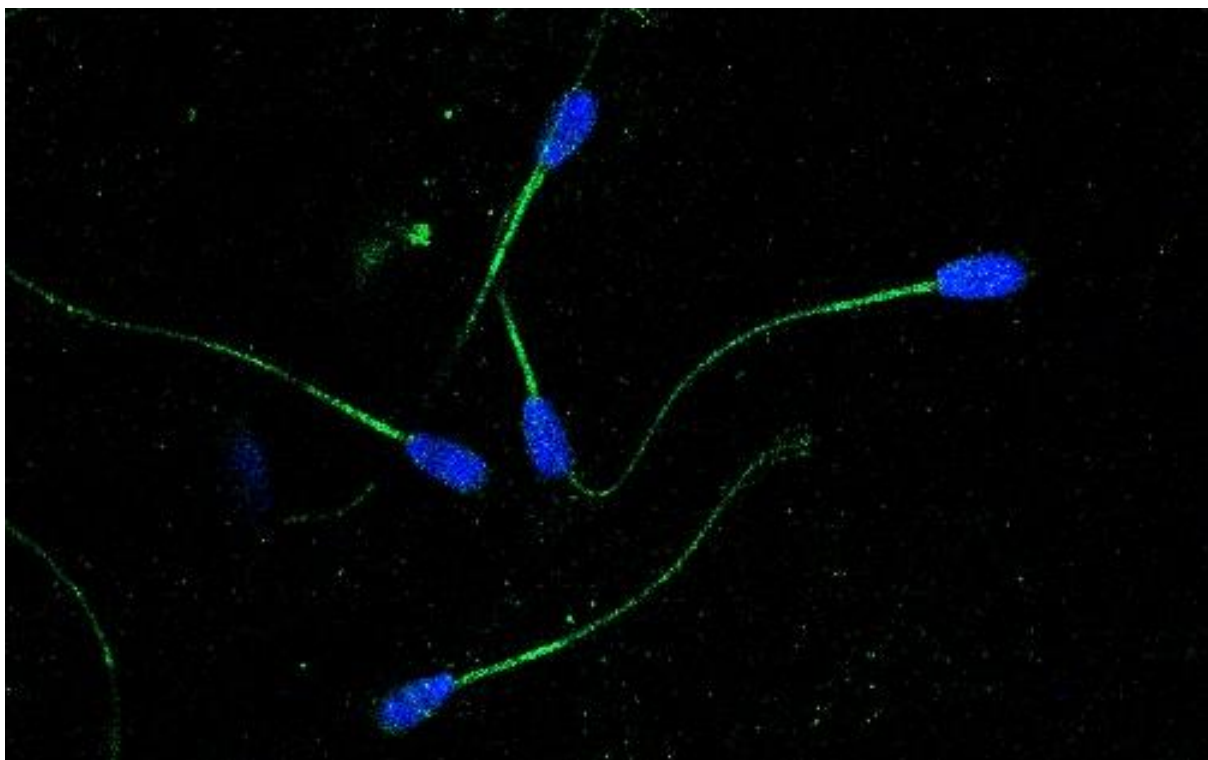
Obr. č. 17 Intenzita signálu CBS v ejakulovaných kančích spermiích, modře chromatin (DAPI), zeleně CBS (Alexa Fluor 488). Zvětšení 630×.



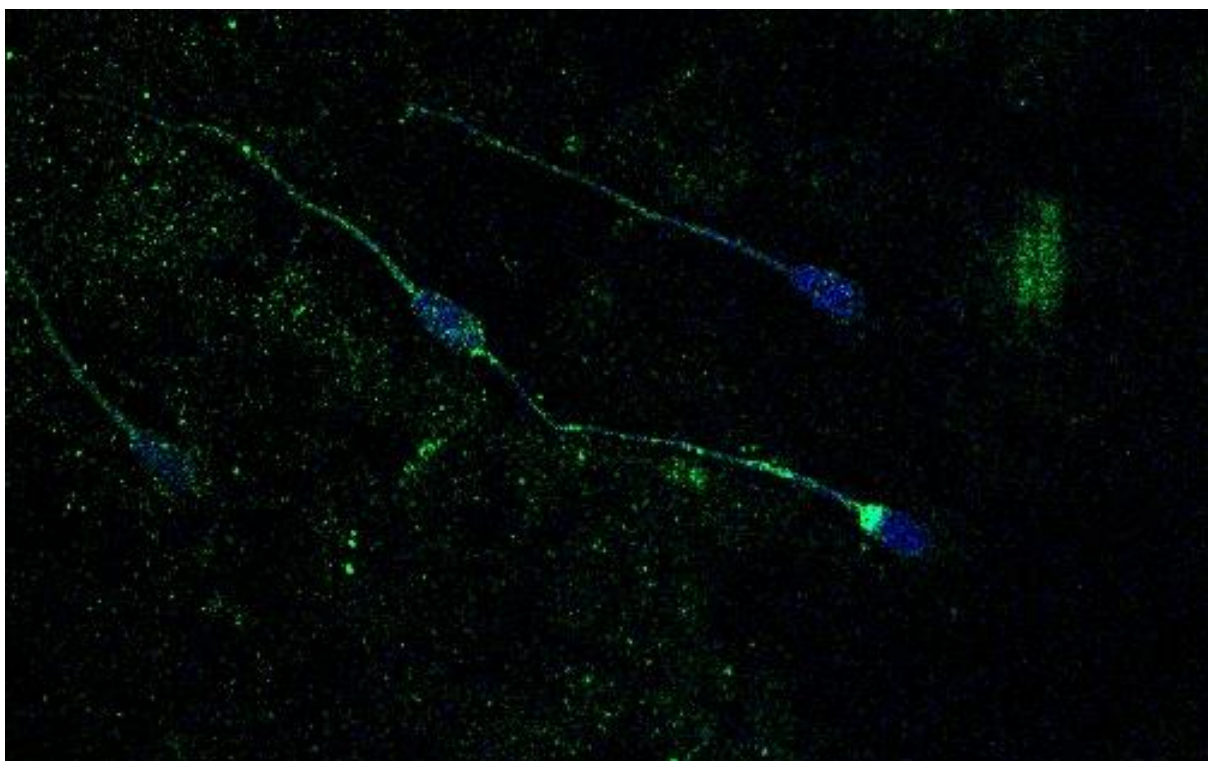
Obr. č. 18: Intenzita signálu CBS v kančích spermích po 30' kapacitace, modře chromatin (DAPI), zeleně CBS (Alexa Fluor 488). Zvětšení 630×.



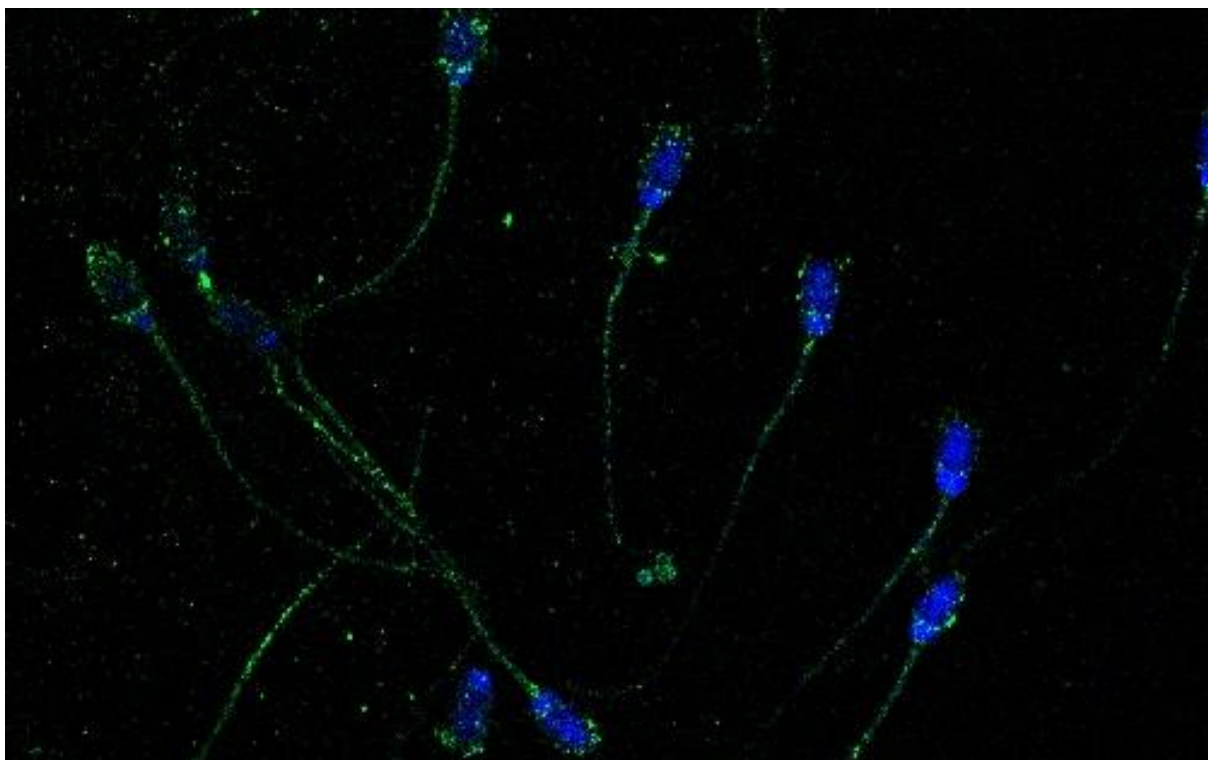
Obr. č. 19: Intenzita signálu CBS v kančích spermích po 60' kapacitace, modře chromatin (DAPI), zeleně CBS (Alexa Fluor 488). Zvětšení 630×.



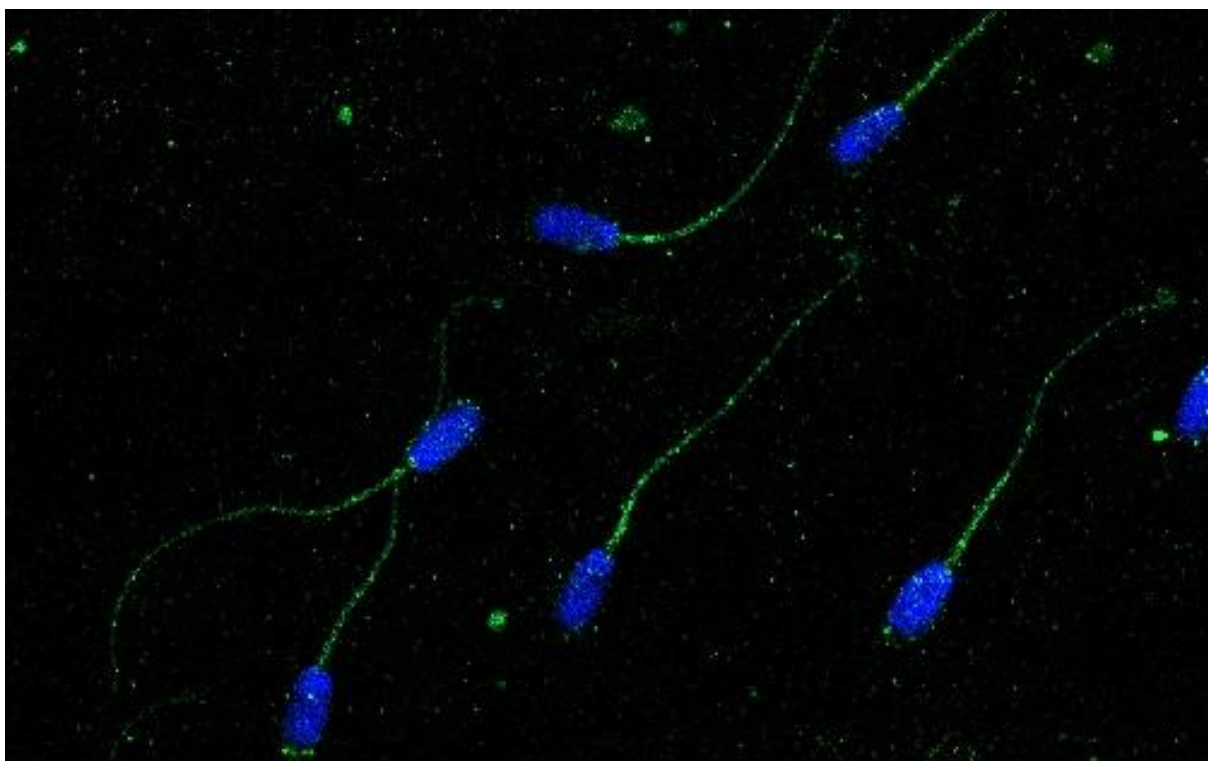
Obr. č. 20: Intenzita signálu CBS v kančích spermích po 90' kapacitace, modře chromatin (DAPI), zeleně CBS (Alexa Fluor 488). Zvětšení 630×.



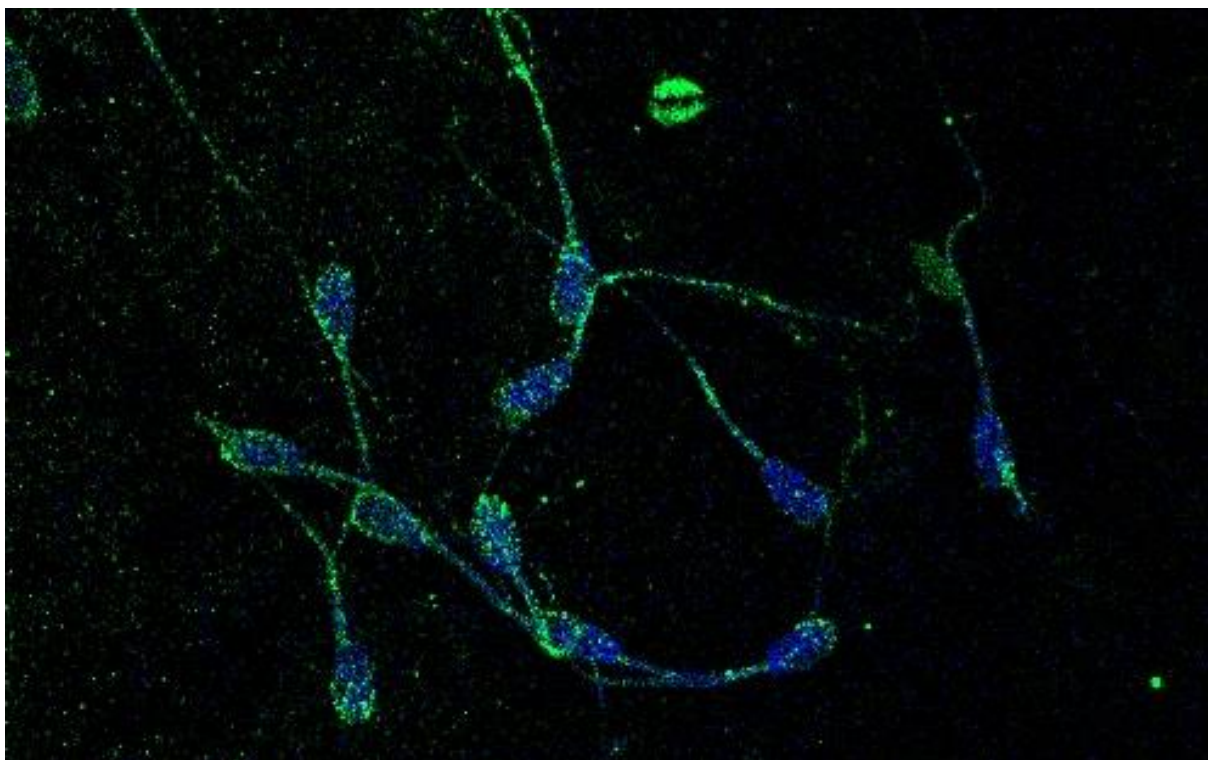
Obr. č. 21: Intenzita signálu CBS v kančích spermích po 120' kapacitace, modře chromatin (DAPI), zeleně CBS (Alexa Fluor 488). Zvětšení 630×.



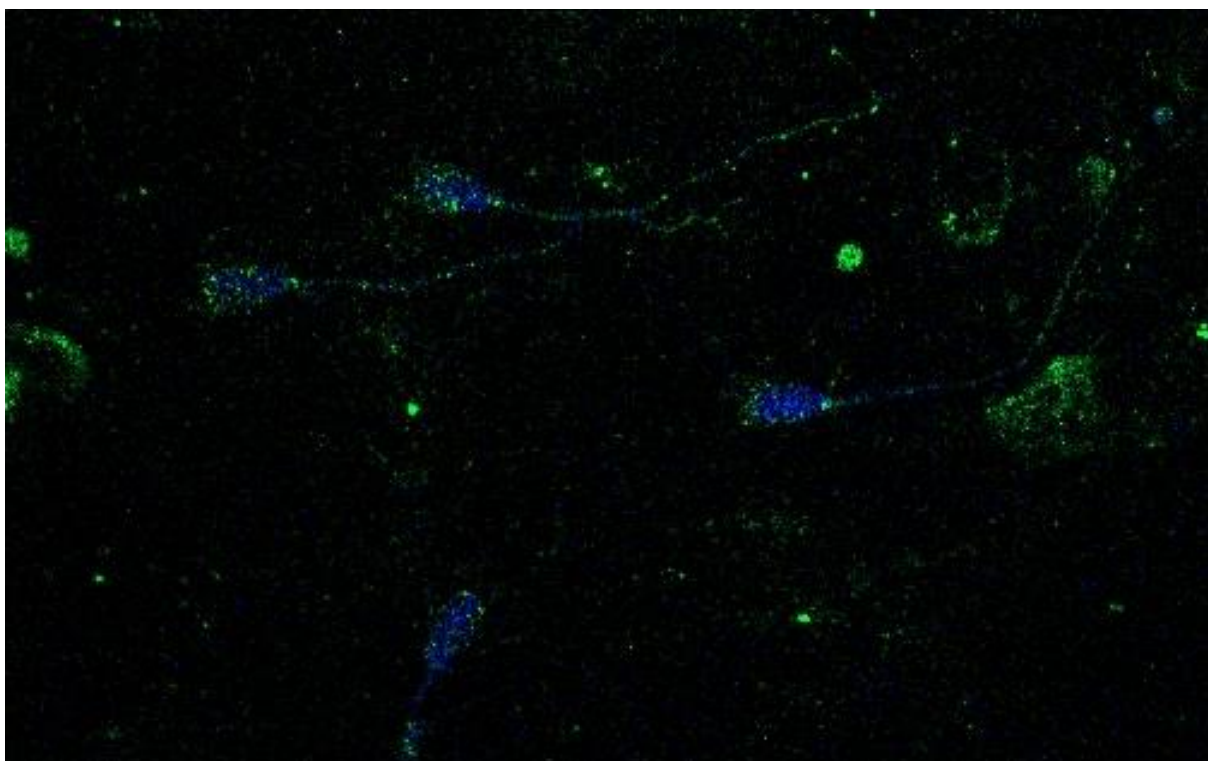
Obr. č. 22: Intenzita signálu CBS v kančích spermíích po 30' kapacitace s donorem H₂S, modře chromatin (DAPI), zeleně CBS (Alexa Fluor 488). Zvětšení 630×.



Obr. č. 23: Intenzita signálu CBS v kančích spermíích po 60' kapacitace s donorem H₂S, modře chromatin (DAPI), zeleně CBS (Alexa Fluor 488). Zvětšení 630×.



Obr. č. 24: Intenzita signálu CBS v kančích spermích po 90' kapacitace s donorem H₂S, modře chromatin (DAPI), zeleně CBS (Alexa Fluor 488). Zvětšení 630×.



Obr. č. 25: Intenzita signálu CBS v kančích spermích po 120' kapacitace s donorem H₂S, modře chromatin (DAPI), zeleně CBS (Alexa Fluor 488). Zvětšení 630×.

6 Diskuze

Sulfan je z hlediska řízení procesů probíhajících v živých buňkách velmi zajímavá molekula. Podle dosavadních výsledků výzkumů se sulfan vyskytuje v řadě tkání, z čehož lze usuzovat, že jeho role při buněčné signalizaci je značná. Sulfan hraje významnou roli například v mozku, kardiovaskulárním systému, v trávicím traktu, ale také v reprodukční soustavě (Reiffenstein & Roth 1992; Distrutti et al. 2006; Zhao et al. 2014; Duan et al. 2015), kde je spojovaný například s erektilní dysfunkcí (d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2009).

V našich experimentech jsme prokázali imunocytochemickou metodou v kančích spermích přítomnost cystathionin- β -syntázy (CBS), enzymu, který je v buňkách za produkci sulfanu zodpovědný. Tento enzym nebyl zatím v dostupné literatuře v kančích spermích popsán, i když jeho exprese byla prokázána například v lidských spermích (Patel et al. 2009).

Z našich výsledků je zřejmé, že intenzita naměřeného signálu je signifikantně rozdílná u ejakulovaných a kapacitovaných spermíí. Nejvyšší průměrná intenzita signálu byla naměřena u ejakulovaných spermíí. U spermíí, které byly kapacitované v nesuplementovaném médiu a v médiu suplementovaném donorem sulfanu, se intenzita signálu CBS postupně snižovala, i když nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v intenzitě signálu mezi spermii kapacitovanými bez donoru sulfanu a s donorem sulfanu. Je zřejmé, že délka kapacitace negativně ovlivnila přežitelnost spermíí. I když Zhao et al. (2016) popsal ve své práci negativní efekt donoru sulfanu na motilitu spermíí, námi pozorovaný negativní vliv délky kapacitace jde na vrub spíše příliš dlouhé době kapacitace. U kanců dochází velmi často ke spontánní kapacitaci ejakulovaných spermíí. Protože byly v experimentech využity inseminační dávky, které měly již malé procento spontánně kapacitovaných spermíí, byla kratší doba kapacitace vhodnější. Výsledky prezentované v této práci byly součástí uceleného experimentu, v rámci kterého byly sledovány i parametry motility u kapacitovaných spermíí po různé době kapacitace. Při dlouhodobější kapacitaci nad jednu hodinu byly naměřené parametry motility výrazně horší než u spermíí kapacitovaných 30 a 60 minut (výsledky nejsou součástí této práce).

Na základě získaných výsledků lze předpokládat, že se sulfan uplatňuje jako signální molekula v kančích spermích a že pravděpodobně hraje roli v procesech spojených s kapacitací spermíí. Pro průkaz této domněnky je ale potřeba dalších experimentů. V dalších experimentech by bylo třeba objasnit úlohu sulfanu při řízení průběhu kapacitace a akrozomální reakce kančích spermíí, stejně jako potenciální zapojení sulfanu do průběhu

samotného oplození. Bylo by také zajímavé zaměřit výzkum na produkci sulfanu z D-cysteinu, protože v dřívějších výzkumech bylo dokázáno, že se sulfan netvoří pouze z L-cysteinu, ale také z D-cysteinu (Shibuya et al. 2013; Kimura 2014). Zajímavým námětem k dalšímu výzkumu je rovněž vztah sulfanu k dalším popsaným gasotransmiterům, NO a CO. Bylo prokázáno, že se tyto plynné signální molekuly navzájem ovlivňují a některé studie se dokonce domnívají, že CBS by mohl být jedním z molekulárních cílů právě pro CO (Taoka & Banerjee 2001; Puranik et al. 2006).

7 Závěr

V ejakulovaných i kapacitovaných kančích spermích byla imunocytochemickou metodou prokázána přítomnost sulfan produkujícího enzymu cystathionin β -syntázy (CBS). V ejakulovaných spermích byla intenzita naměřeného signálu signifikantně vyšší než ve spermích kapacitovaných. S dobou kapacitace se intenzita signálu snižovala. Na základě získaných výsledků lze předpokládat, že se sulfan uplatňuje jako signální molekula v kančích spermích a že pravděpodobně hraje roli v procesech spojených s kapacitací spermí. Pro průkaz této domněnky je ale potřeba dalších experimentů

8 Seznam literatury

- Abe K, Kimura H. 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of Neuroscience* **16**:1066 - 1071.
- Alberts B. 1998. *Základy buněčné biologie*. Espero, Ústí nad Labem.
- Ali M, Ping C, Mok Y, Ling L, Whiteman M, Bhatia M, Moore P. 2006. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide?. *British Journal of Pharmacology* **149**:625 - 634.
- Austin C, Bishop M. 1958. Some Features of the Acrosome and Perforatorium in Mammalian Spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **149**:234 - 240.
- Bartůňková J, Paulík M. 2005. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Grada, Praha.
- Bedford J. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*. Supplement **2**:128 - 158.
- Bedford J, Cross N. 1998. Sperm capacitation. Pages 597 - 602 in *Encyclopedia of Reproduction*, 1. Academic Press.
- Belardinelli M, Chabli A, Kamoun P. 2001. Urinary Sulfur Compounds in Down Syndrome. *Clinical Chemistry* **47**:1500 - 1501.
- Berruti G, Paiardi C. 2011. Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis* **1**:95 - 98.
- Bertova A, Cacanyiova S, Kristek F, Krizanova O, Ondrias K, Tomaskova Z. 2010. The hypothesis of the main role of H₂S in coupled sulphide-nitroso signalling pathway. *General Physiology and Biophysics* **29**:402 - 410.

- Bucci M, Mirone V, Di Lorenzo A, Vellecco V, Roviezzo F, Brancaleone V, Ciro I, Cirino G. 2009. Hydrogen sulphide is involved in testosterone vascular effect. *European Urology* **56**:378 - 383.
- Burnett A, Lowenstein C, Brecht D, Chang T, Snyder S. 1992. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*. **257**:401 - 403.
- Campbell N, Reece J. 2006. *Biologie*. Computer Press, Brno.
- Collin M, Thiemermann C. 2005. Hydrogen sulfide and sulfite: novel mediators in the pathophysiology of shock and inflammation. *Shock*. **24**:595 - 596.
- Cooper A. 1983. Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annual Review of Biochemistry* **52**:187 - 222.
- Cosson J. 1996. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. *Cell Biology International* **20**:83 - 94.
- Cummins J, Woodall P. 1985. On mammalian sperm dimensions. *Reproduction* **75**:153 - 175.
- Dam A, Feenstra I, Westphal J, Ramos L, Golde R, Kremer J. 2007. Globozoospermia revisited. *Human Reproduction Update* **13**:63 - 75.
- Daniels K, Stipanuk M. 1982. The effect of dietary cysteine level on cysteine metabolism in rats. *Journal of Nutrition* **112**:2130 - 2141.
- d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Maffia P, Mirone V, Imbimbo C, Fusco F, De Palma R, Ignarro L. 2009. Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:4513 - 4518.
- d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Mirone V, Cirino G. 2011. Hydrogen sulfide and erectile function: a novel therapeutic target. *Nature Reviews Urology* **8**:286 - 289.

- Demott R, Suarez S. 1992. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biology of Reproduction* **46**:779 - 785.
- Dicker-Brown A, Fonseca V, Fink L, Kern P. 2001. The effect of glucose and insulin on the activity of methylene tetrahydrofolate reductase and cystathionine-beta-synthase: studies in hepatocytes. *Atherosclerosis*. **158**:297 - 301.
- Distrutti E et al. 2006. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **316**:325 - 335.
- Diwakar L, Ravindranath V. 2007. Inhibition of cystathionine-gamma-lyase leads to loss of glutathione and aggravation of mitochondrial dysfunction mediated by excitatory amino acid in the CNS. *Neurochemistry International* **50**:418 - 426.
- Duan F, Li Y, Chen L, Zhou X, Chen J, Chen H, Li R. 2015. Sulfur inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer in vivo. *Oncology Letters* **9**:437 - 441.
- Du J, Hui Y, Cheung Y, Bin G, Jiang H, Chen X, Tang C. 2004. The possible role of hydrogen sulfide as a smooth muscle cell proliferation inhibitor in rat cultured cells. *Heart Vessels*. **19**:75 - 80.
- Dvořáková K, Moore H, Šebková N, Paleček J. 2005. Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction* **130**:61 - 69.
- Eisenbach M. 1999. Sperm chemotaxis. *Reviews of Reproduction* **4**:56 - 66.
- Enokido Y, Suzuki E, Iwasawa K, Namekata K, Okazawa H. 2005. Cystathionine beta-synthase, a key enzyme for homocysteine metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse CNS. *The FASEB Journal* **19**:1854 - 1856.
- Faro M, Fox B, Whatmore J, Winyard P, Whiteman M. 2014. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric Oxide* **41**:38 - 47.

- Fawcett D. 1975. The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology* **vol. 44**:394-436.
Available from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/001216067590411X>.
- Feifer A, Carrier S. 2008. Pharmacotherapy for erectile dysfunction. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **17**:679 - 690.
- Fléchon J. 2016. The acrosome of eutherian mammals: revue littéraire mensuelle. *Cell and Tissue Research* **363**:147 - 157.
- Florman H, Ducibella T. 2014. Fertilization in Mammals. Pages 55 - 112 in Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*, 4. Academic Press.
- Frendo J, Wróbel M. 1997. The activity of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in erythrocytes from patients with polycythemia vera. *Acta Biochimica Polonica* **44**:771 - 773.
- Furne J, Springfield J, Koenig T, DeMaster E, Levitt M. 2001. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochemical Pharmacology* **62**:255 - 259.
- Gai J-W, Wahafu W, Guo H, Liu M, Wang X-C, Xiao Y-X, Zhang L, Xin Z-C, Jin J. 2013. Further evidence of endogenous hydrogen sulphide as a mediator of relaxation in human and rat bladder. *Asian Journal of Andrology* **15**:692 - 696.
- Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C. 2004a. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **318**:756 - 763.
- Geng B, Yang J, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C. 2004b. H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**:362 - 368.

- Gerton G. 2002. Function of the sperm acrosome. *Fertilization*:265 - 302. Academic Press, San Diego.
- Ghasemi M, Dehpour A, Moore K, Mani A. 2012. Role of endogenous hydrogen sulfide in neurogenic relaxation of rat corpus cavernosum. *Biochemical Pharmacology* **83**:1261 - 1268.
- Guo H, Gai J, Wang Y, Jin H, Du J, Jin J. 2012. Characterization of hydrogen sulfide and its synthases, cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase, in human prostatic tissue and cells. *Urology* **79**:483.
- Gur S, Kadowitz P, Sikka S, Peak T, Hellstrom W. 2015. Overview of potential molecular targets for hydrogen sulfide: A new strategy for treating erectile dysfunction. *Nitric Oxide* **50**:65 - 78.
- Guzmán M et al. 2006. Cystathionine beta-synthase is essential for female reproductive function. *Human Molecular Genetics* **15**:3168 - 3176.
- Hancock J, Whiteman M. 2014. Hydrogen sulfide and cell signaling: team player or referee?. *Plant Physiology and Biochemistry* **78**:37 - 42.
- Han Y, Qin J, Chang X, Yang Z, Du J. 2005. Hydrogen sulfide may improve the hippocampal damage induced by recurrent febrile seizures in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **327**:431 - 436.
- Hayden L, Franklin K, Roth S, Moore G. 1989. Inhibition of oxytocin-induced but not angiotensin-induced rat uterine contractions following exposure to sodium sulfide. *Life Sciences* **45**:2557 - 2560.
- Hellmich M, Coletta C, Chao C, Szabo C. 2014. The Therapeutic Potential of Cystathionine β -Synthetase/Hydrogen Sulfide Inhibition in Cancer. *Antioxidants & Redox Signaling* **22**:424 - 448.

- Hong M, Tang X, He K. 2014. Effect of hydrogen sulfide on human colon cancer SW480 cell proliferation and migration in vitro. *Journal of Southern Medical University* **34**:699 - 703.
- Hořejší V, Bartůňková J. 2009. *Základy imunologie*, 4. vyd. Triton, Praha.
- Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. 1997. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **237**:527 - 531.
- Huang Y, Cheng X, Jiang R. 2012. Hydrogen sulfide and penile erection. *National Journal of Andrology* **18**:823 - 826.
- Hughes M, Centelles M, Moore K. 2009. Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. *Free Radical Biology and Medicine* **47**:1346 - 1353.
- Chang M. 1957. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature* **179**:258 - 259.
- Cheng Y, Ndisang J, Tang G, Wang R. 2004. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **287**:H2316 - H2323.
- Chen X, Jhee K, Kruger W. 2004. Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *Journal of Biological Chemistry* **279**:52082 – 52086.
- Chiku T, Padovani D, Zhu W, Singh S, Vitvitsky V, Banerjee R. 2009. H₂S biogenesis by human cystathionine gamma-lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia. *Journal of Biological Chemistry* **284**:11601 - 11612.

- Chi X, Ouyang X, Wang Y. 2014. Hydrogen sulfide synergistically upregulates *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced expression of IL-6 and IL-8 via NF- κ B signalling in periodontal fibroblasts. *Archives of Oral Biology* **59**:954 - 961.
- Iciek M, Bilska A, Ksiazek L, Srebro Z, Wlodek L. 2005. Allyl disulfide as donor and cyanide as acceptor of sulfane sulfur in the mouse tissues. *Pharmacological Reports* **57**:212 -218.
- Ignarro L, Bush P, Buga G, Wood K, Fukuto J, Rajfer J. 1990. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **170**:843 - 850.
- Ichinohe A, Kanaumi T, Takashima S, Enokido Y, Nagai Y, Kimura H. 2005. Cystathionine beta-synthase is enriched in the brains of Down's patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**:1547 - 1550.
- Ishigami M, Hiraki K, Umemura K, Ogasawara Y, Ishii K, Kimura H. 2009. A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain. *Antioxidants & Redox Signaling* **11**:204 - 214.
- Jacobs R, House J, Brosnan M, Brosnan J. 1998. Effects of streptozotocin-induced diabetes and of insulin treatment on homocysteine metabolism in the rat. *Diabetes*. **47**:1967 - 1970.
- Jacobs R, Stead L, Brosnan M, Brosnan J. 2001. Hyperglucagonemia in rats results in decreased plasma homocysteine and increased flux through the transsulfuration pathway in liver. *Journal of Biological Chemistry* **276**:43740 - 43747.
- Jaiswal B, Eisenbach M. 2002. Capacitation. *Fertilization*:57 - 115.
- Jelínek P, Koudela K. 2003. *Fyziologie hospodářských zvířat*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno.

- Jeong S, Pae H, Oh G, Jeong G, Lee B, Lee S, Kim d, Rhew H, Lee K, Chung H. 2006. Hydrogen sulfide potentiates interleukin-1beta-induced nitric oxide production via enhancement of extracellular signal-regulated kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **345**:938 - 944.
- Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba S, Chiba K, 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**:4892 - 4896.
- Junqueira L, Carneiro J, Kelley R. 1997. *Základy histologie*. H+H, Jinočany.
- Kamoun P. 2004. Endogenous production of hydrogen sulfide in mam. *Amino Acids* **26**:243 - 254.
- Kaneko Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I. 2006. L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes*. **55**:1391 - 1397.
- Kang-Decker N, Mantchev G, Juneja S, McNiven M, Van Deursen J. 2001. Lack of acrosome formation in hrb-deficient mice. *Science* **294**:1531 - 1533.
- Kawabata A, Ishiki T, Nagasawa K, Yoshida S, Maeda Y, Takahashi T, Wada T, Ichida S, Nishikawa H. 2007. Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger. *Pain*. **132**:74 - 81.
- Kimura H. 2000. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **267**:129 - 133.
- Kimura H. 2011. Hydrogen sulfide: its production, release and functions. *Amino Acids* **41**:113 - 121.
- Kimura H. 2013. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. *Neurochemistry International* **63**:492 - 497.
- Kimura H. 2014. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric Oxide* **41**:4 - 10.

- Kimura Y, Dargusch R, Schubert D, Kimura H. 2006. Hydrogen Sulfide Protects HT22 Neuronal Cells from Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* **8**:661 - 670.
- Kimura Y, Kimura H. 2004. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *The FASEB Journal* **18**:1165 - 1167.
- Kondo K et al. 2013. H₂S Protects Against Pressure Overload–Induced Heart Failure via Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation*. **127**:1116 - 1127.
- Kopf G. 2002. Signal transduction mechanisms regulating sperm acrosomal exocytosis. *Fertilization*:181 - 223.
- Kubo S, Doe I, Kurokawa Y, Kawabata A. 2007. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: Contribution to dual modulation of vascular tension. *Toxicology* **232**:138 - 146.
- Kuo S, Stipanuk M. 1983. Developmental pattern, tissue distribution, and subcellular distribution of cysteine: alpha-ketoglutarate aminotransferase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase activities in the rat. *Biology of the Neonate* **43**:23 - 32.
- La Spina F, Puga Molina L, Romarowski A, Vitale A, Falzone T, Krapf D, Hirohashi N, Buffone M. 2016. Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Developmental Biology* **411**:172 - 182.
- Lee S, Hu Y, Hu L, Lu Q, Dawe G, Moore P, Wong P, Bian J. 2006. Hydrogen sulphide regulates calcium homeostasis in microglial cells. *Glia*. **54**:116 - 124.
- Lefer D. 2007. A new gaseous signaling molecule emerges: cardioprotective role of hydrogen sulfide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**:17907 - 17908.
- Levitt M, Furne J, Springfield J, Suarez F, DeMaster E. 1999. Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. *Journal of Clinical Investigation* **104**:1107 - 1114

- Liang R, Yu W, Du J, Yang L, Shang M, Guo J. 2006. Localization of cystathionine beta synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. *Chinese Medical Journal* **119**:1877 - 1883.
- Liang R, Yu W, Du J, Yang L, Yang J, Xu J, Shang M, Guo J. 2007. Cystathionine beta synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reproductive Toxicology* **24**:89 - 96.
- Li L, Moore P. 2008. Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air?. *Trends in Pharmacological Sciences* **29**:84 - 90.
- Lin Y, Roy A, Yan W, Burns K, Matzuk M. 2007. Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* **27**:6794 - 6805.
- Litscher E, Williams Z. 2009. Zona Pellucida Glycoprotein ZP3 and Fertilization in Mammals. *Molecular Reproduction and Development* **10**:933 - 941.
- Liu M, Wu L, Montaut S, Yang G. 2016. Hydrogen Sulfide Signaling Axis as a Target for Prostate Cancer Therapeutics. *Prostate Cancer* **vol. 2016**:1-9. Available from <http://www.hindawi.com/journals/pc/2016/8108549/>.
- Longo F. 1987. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *The Journal of Cell Biology* **105**:1105 - 1020.
- Łowicka E, Bełtowski J. 2007. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological Reports* **59**:4 - 24.
- Macfarlane G, Gibson G, Cummings J. 1992. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *Journal of Applied Microbiology* **72**:57 - 64.

- Maeda Y, Aoki Y, Sekiguchi F, Matsunami M, Takahashi T, Nishikawa H, Kawabata A. 2009. Hyperalgesia induced by spinal and peripheral hydrogen sulfide: Evidence for involvement of Cav3.2 T-type calcium channels. *Pain* **142**:127 - 132.
- Major Differences. 2013. Difference between Spermatogenesis and Spermiogenesis. Available at <https://www.majordifferences.com/2013/06/difference-between-spermatogenesis-and.html#.XKODRZgzaCj> (accessed April 02, 2019).
- Marques-da-Silva D, Samhan-Arias A, Tiago T, Gutierrez-Merino C. 2010. L-type calcium channels and cytochrome b5 reductase are components of protein complexes tightly associated with lipid rafts microdomains of the neuronal plasma membrane. *Journal of Proteomics* **73**:1502 - 1510.
- Marvan F. 2017. *Morfologie hospodářských zvířat*. Česká zemědělská univerzita v Praze v nakladatelství Brázda, Praha.
- Mitsuhashi H, Ikeuchi H, Nojima Y. 2001. Is sulfite an antiatherogenic compound in wine?. *Clinical Chemistry* **47**:1872 - 1873.
- Mitsuhashi H, Yamashita S, Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiromura K, Ueki K, Nojima Y. 2005. Oxidative stress-dependent conversion of hydrogen sulfide to sulfite by activated neutrophils. *Shock* **24**:529 - 534.
- Monroy A. 2018. Fertilization: Events Of Fertilization. Available at <https://www.britannica.com/science/fertilization-reproduction#ref606598> (accessed April 02, 2019).
- Nagahara N, Nishino T. 1996. Role of amino acid residues in the active site of rat liver mercaptopyruvate sulfurtransferase. CDNA cloning, overexpression, and site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **271**:27395 - 27401.

- Nagai Y, Tsugane M, Oka J, Kimura H. 2004. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *The FASEB Journal* **18**:557 - 559.
- Nagata T, Kage S, Kimura K, Kudo K, Noda M. 1990. Sulfide concentrations in postmortem mammalian tissues. *Journal of Forensic Sciences* **35**:706 - 712.
- Ogasawara M, Umemura K, Nagai Y, Kimura H. 2002. Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation. *The Journal of Neuroscience* **22**:3386 - 3391.
- Ogasawara Y, Ishii K, Togawa T, Tanabe S. 1993. Determination of bound sulfur in serum by gas dialysis/high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* **215**:73 - 81.
- Ogasawara Y, Tanabe S. 1994. Tissue and subcellular distribution of bound and acid-labile sulfur, and the enzymic capacity for sulfide production in the rat. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **17**:1535 - 1542.
- Oh G, Pae H, Lee B, Kim B, Kim J, Kim H, Jeon S, Jeon W, Chae H, Chung H. 2006. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radical Biology and Medicine* **41**:106 - 119.
- Oi Y, Imafuku M, Shishido C, Kominato Y, Nishimura S, Iwai K. 2001. Garlic supplementation increases testicular testosterone and decreases plasma corticosterone in rats fed a high protein diet. *Journal of Nutrition* **131**:2150 - 2156.
- Okabe M. 2013. The cell biology of mammalian fertilization. *Development* **140**:4471 - 4479.
- Olas B. 2014. Hydrogen sulfide in hemostasis: Friend or foe?. *Chemico-Biological Interactions* **217**:49 - 56.
- Olas B. 2015. Hydrogen sulfide in signaling pathways. *Clinica Chimica Acta* **439**:212 - 218.

- Olson K, DeLeon E, Liu F. 2014. Controversies and conundrums in hydrogen sulfide biology. *Nitric Oxide* **41**:11 - 26.
- Olson KR. 2009. Is hydrogen sulfide a circulating “gasotransmitter” in vertebrate blood?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1787**:856 - 863.
- Ondrias K, Stasko A, Cacanyiova S, Sulova Z, Krizanova O, Kristek F, Malekova L, Knezl V, Breier A. 2008. H₂S and HS⁻ donor NaHS releases nitric oxide from nitrosothiols, metal nitrosyl complex, brain homogenate and murine L1210 leukaemia cells. *European Journal of Physiology* **457**:271 - 279.
- Patacchini R, Santicioli P, Giuliani S, Maggi C. 2005. Pharmacological investigation of hydrogen sulfide (H₂S) contractile activity in rat detrusor muscle. *European Journal of Pharmacology* **509**:171 - 177.
- Patel P, Vatish M, Heptinstall J, Wang R, Carson R. 2009. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reproductive Biology and Endocrinology* **7**:10.
- Picton R, Eggo M, Merrill G, Langmann M, Singh S. 2002. Mucosal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese. *Gut* **50**:201 - 205.
- Polhemus D, Lefer D. 2014. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. *Circulation Research* **114**:730 - 737.
- Polhemus D, Kondo K, Bhushan S, Bir S, Kevil C, Murohara T, Lefer D, Calvert J. 2013. Hydrogen Sulfide Attenuates Cardiac Dysfunction After Heart Failure Via Induction of Angiogenesis. *Circulation: Heart Failure* **6**:1077 - 1086.
- Puranik M, Weeks C, Lahaye D, Kabil Ö, Taoka S, Nielsen S, Groves J, Banerjee R, Spiro T. 2006. Dynamics of Carbon Monoxide Binding to Cystathionine β-Synthase. *Journal of Biological Chemistry* **281**:13433 - 13438.

- Qu K, Chen C, Halliwell B, Moore P, Wong P. 2006. Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage. *Stroke*. **37**:889 - 893.
- Ratnam S, Maclean K, Jacobs R, Brosnan M, Kraus J, Brosnan J. 2002. Hormonal regulation of cystathionine beta-synthase expression in liver. *Journal of Biological Chemistry* **277**:42912 - 42918.
- Reiffenstein R, Roth S. 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **32**:109 - 134.
- Shibuya N, Koike S, Tanaka M, Ishigami-Yuasa M, Ogasawara Y, Fukui K, Nagahara N, Kimura H. 2013. A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nature Communications* **4**.
- Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. 2009a. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *Journal of Biochemistry* **146**:623 - 626.
- Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Tagawa T, Ishii K, Kimura H. 2009b. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants & Redox Signaling* **11**:703 - 714.
- Schalinske K. 2003. Interrelationship between diabetes and homocysteine metabolism: hormonal regulation of cystathionine beta-synthase. *Nutrition Reviews* **61**:136 - 138.
- Sidhu R, Singh M, Samir G, Carson R. 2001. L-cysteine and sodium hydrosulphide inhibit spontaneous contractility in isolated pregnant rat uterine strips in vitro. *Pharmacology & Toxicology* **88**:198 - 203.

- Sitdikova G, Weiger T, Hermann A. 2010. Hydrogen sulfide increases calcium-activated potassium (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* **459**:389 - 397.
- Sivarajah A, Collino M, Yasin M, Benetti E, Gallicchio M, Mazzon E, Cuzzocrea S, Fantozzi R, Thiemermann C. 2009. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. *Shock*. **31**:267 - 274.
- Springate L, Frasier T. 2017. Gamete compatibility genes in mammals: candidates, applications and a potential path forward. *Royal Society Open Science* **4**:170577.
- Srilatha B, Adaikan P, Moore P. 2006. Possible role for the novel gasotransmitter hydrogen sulphide in erectile dysfunction—a pilot study. *European Journal of Pharmacology* **535**:280 - 282.
- Srilatha B, Adaikan P, Moore P. 2007. Hydrogen Sulphide: A Novel Endogenous Gasotransmitter Facilitates Erectile Function. *The Journal of Sexual Medicine* **4**:1304 - 1311.
- Srilatha B, Hu L, Moore P. 2009. Initial characterization of hydrogen sulfide effects in female sexual function. *The Journal of Sexual Medicine* **6**:1875 - 1884.
- Stauss C, Votta T, Suarez S. 1995. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biology of Reproduction* **53**:1280 - 1285.
- Stipanuk M. 2004. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annual Review of Nutrition* **24**:539 - 577.
- Stipanuk M, De la Rosa J, Hirschberger L. 1990. Catabolism of cysteine by rat renal cortical tubules. *Journal of Nutrition* **120**:450 - 458.
- Streng T, Axelsson H, Hedlund P, Andersson D, Jordt S, Bevan S, Andersson K, Högestätt E, Zygmunt P. 2008. Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. *European Urology Supplements* **53**:391 - 399.

StudyPage.in. 2007. Male Reproductive System. Available at <https://www.studypage.in/biology/male-reproductive-system> (accessed April 02, 2019).

Sugiura Y, Kashiba M, Maruyama K, Hoshikawa K, Sasaki R, Saito K, Kimura H, Goda N, Suematsu M. 2005. Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. *Antioxidants & Redox Signaling* **7**:781 - 787.

Sutovsky P. 2011. Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction* **142**:1 - 14.

Tan B, Wong P, Bian J. 2010. Hydrogen sulfide: a novel signaling molecule in the central nervous system. *Neurochemistry International* **56**:3 - 10.

Tang X, Lalli M, Clermont Y. 1982. A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. *American Journal of Anatomy* **163**:283 - 294.

Tanizawa K. 2011. Production of H₂S by 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase. *Journal of Biochemistry* **149**:357 - 359.

Taoka S, Banerjee R. 2001. Characterization of NO binding to human cystathionine beta-synthase: possible implications of the effects of CO and NO binding to the human enzyme. *Journal of Inorganic Biochemistry* **87**:245 - 51.

Toda N, Ayajiki K, Okamura T. 2005. Nitric oxide and penile erectile function. *Pharmacology & Therapeutics* **106**:233 - 266.

Tomaskova Z, Bertova A, Ondrias K. 2011. On the Involvement of H₂S in Nitroso Signaling and Other Mechanisms of H₂S Action. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **12**:1394 - 1405.

Toohey J. 1989. Sulphane sulphur in biological systems: a possible regulatory role. *Biochemical Journal* **264**:625 - 632.

- Ubuka T, Umemura S, Yuasa S, Kinuta M, Watanabe K. 1978. Purification and characterization of mitochondrial cysteine aminotransferase from rat liver. *Physiological Chemistry and Physics* **10**:483 - 500.
- Vitvitsky V, Thomas M, Ghorpade A, Gendelman H, Banerjee R. 2006. A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* **281**:35785 - 35793.
- Wang J et al. 2018. Hydrogen Sulfide As a Potential Target in Preventing Spermatogenic Failure and Testicular Dysfunction. *Antioxidants & Redox Signaling* **28**:1447 - 1462.
- Wang R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter?. *The FASEB Journal* **16**:1792 - 1798.
- Wang R. 2012. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiological Reviews* **92**:791 - 896.
- Wassarman P, Jovine L, Litscher E. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biology* **3**:59 - 64.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES, Qi H, Williams Z. 2004. Egg-sperm interactions at fertilization in mammals. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **115**:557 - 560.
- Wassarman P, Jovine L, Qi H, Williams Z, Darie C, Litscher E. 2005. Recent aspects of mammalian fertilization research. *Molecular and Cellular Endocrinology* **234**:95 - 103.
- Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Malinow M, Maeda N. 1995. Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**:1585 - 1989.

- Whiteman M, Armstrong J, Chu S, Jia-Ling S, Wong B, Cheung N, Moore P. 2004. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'?. *Journal of Neurochemistry* **90**:765 - 768.
- Whiteman M, Cheung N, Zhu Y, Chu S, Siau J, Wong B, Armstrong J, Moore P. 2005. Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain?. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **326**:794 - 798.
- Whiteman M, Li L, Kostetski I, Chu S, Siau J, Moore P. 2006. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **343**:303 - 310.
- Whiteman M, Moore P. 2009. Hydrogen sulfide and the vasculature: a novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability?. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **13**:488 - 507.
- Xiao L, Wu Y, Zhang H, Liu Y, He R. 2006. Hydrogen sulfide facilitates carotid sinus baroreflex in anesthetized rats. *Acta Pharmacologica Sinica* **27**:294 - 298.
- Xu S, Liz Z, Liu P. 2014. Targeting hydrogen sulfide as a promising therapeutic strategy for atherosclerosis. *International Journal of Cardiology* **172**:313 - 317.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*:189 - 317.
- Yang G et al. 2008. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*. **322**:587 - 590.
- Yang G, Zhao K, Ju Y, Mani S, Cao Q, Puukila S, Khaper N, Wu L, Wang R. 2013. Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via S-sulfhydration of Keap1 and activation of Nrf2. *Antioxidants & Redox Signaling* **18**:1906 - 1919.

- Yang W, Yang G, Jia Y, Wu L, Wang R. 2005. Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *The Journal of Physiology* **569**:519 - 531.
- Yusuf M, Kwong Huat B, Hsu A, Whiteman M, Bhatia M, Moore P. 2005. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **333**:1146 - 1152.
- Yu X, Cui L, Wu K, Zheng X, Chen Z, Tang C. 2014. Hydrogen sulfide as a potent cardiovascular protective agent. *Clinica Chimica Acta* **437**:78 - 87.
- Zhao Y et al. 2016. Hydrogen Sulfide and/or Ammonia Reduces Spermatozoa Motility through AMPK/AKT Related Pathways. *Scientific Reports* **6**:37884.
- Zhao K, Li S, Wu L, Lai C, Yang G. 2014. Hydrogen Sulfide Represses Androgen Receptor Transactivation by Targeting at the Second Zinc Finger Module. *Journal of Biological Chemistry* **289**:20824 - 20835.
- Zhao W, Wang R. 2002. H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **283**:474 - 480.
- Zhao W, Zhang J, Wang R. 2001. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *The EMBO Journal* **20**:6008 - 6016.
- Zhu X, Gu H, Ni X. 2011. Hydrogen sulfide in the endocrine and reproductive systems. *Expert Reviews* **4**:75 - 82.
- Zhu X, Liu S, Liu Y, Wang S, Ni X. 2010. Glucocorticoids suppress cystathionine gamma-lyase expression and H₂S production in lipopolysaccharide-treated macrophages. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**:1119 - 1132.