



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra zootechnických věd

Diplomová práce

Endogenně produkováný sulfan v reprodukčním traktu samice
ve vztahu k fertilizaci

Autor práce: Bc. Jiří Brichcín

Vedoucí práce: doc. Ing. Roman Konečný, Ph.D.

Konzultant práce: doc. Ing. Jan Nevorál, Ph.D.

České Budějovice
2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

Odhalení mechanismů zodpovědných za správný průběh oplození a časného embryonálního vývoje pomáhá v rozvoji asistované reprodukce člověka a technologií v chovech hospodářských zvířat. Jedním z regulačních mechanismů zapojených do reprodukce je gasotransmitter sulfan, jehož buněčná signalizace v pohlavních buňkách je dosud plně nepopsána.

Dle stanovené hypotézy je sulfan uvolňován v samičím traktu, kde fyziologicky ovlivňuje spermie a je tak nezbytný pro oplození a vývoj prvojader. Cílem bylo ověřit expresi sulfan-uvolňujících enzymů a existenci časo-prostorového gradientu sulfanu v rámci estrálního cyklu myši (časová osa) a porovnání expresního profilu ampuly vejcovodu a uterotubálního spoje (prostorová osa). Experimenty probíhaly na modelu laboratorní myši (*Mus musculus*). Expres sulfan-uvolňujících enzymů byla studována pomocí western blotu. Produkce sulfanu byla stanovena kolorimetrickou metodou. Úloha sulfanu v procesu oplození byla studována pomocí *in vitro* fertilizace spermii ošetřenými donorem sulfanu a imunocytochemického barvení takto vzniklých zygot.

V rámci vaječníku a vejcovodu byla zjištěna exprese všech známých sulfan-uvolňujících enzymů, tj. cystationin- γ -lyázy (CTH), cystationin- β -syntázy (CBS) a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázy (3-MPST). Ani jeden z enzymů nevykazoval statisticky významné odlišnosti v expresi ve fázi estru a diestru. Analogické výsledky byly zjištěny i v rámci prostorové osy; ampula vejcovodu i uterotubální spoj exprimovaly enzymy CTH, CBS i 3-MPST, statistické odlišnosti však zaznamenány nebyly. To platí i v případě produkce sulfanu těmito tkáněmi. Vliv sulfanu na proces oplození byl analyzován podle laminu B1, markeru vývoje paternálního prvojádra. Provedená analýza nepotvrdila vliv donoru sulfanu na vývoj prvojader zygot.

Práce prokázala, že sulfan je enzymaticky uvolňován tkáněmi reprodukčního traktu samice, bez ohledu na fázi estrálního cyklu či lokalizaci ve vejcovodu. Sulfan, který pochází z reprodukčního traktu samice, zde patrně fyziologicky ovlivňuje spermie, které jsou oplození schopné a vedou k vývoji prvojader.

Klíčová slova: sulfan, sulfan-uvolňující enzymy, CTH, CBS, 3-MPST, vaječník, vejcovod, zygota, IVF

Abstract

The discovery of the mechanisms responsible for the proper process of fertilization and early embryonic development helps in the development of assisted human reproduction and technologies in livestock breeding. One of the regulatory mechanisms involved in reproduction is the gasotransmitter hydrogen sulfide, whose cellular signaling in germ cells is not fully described yet.

According to the hypothesis, hydrogen sulfide is released in the female reproductive tract, where it physiologically affects sperm and is necessary for fertilization and the development of pronuclei. The aim was to verify the expression of hydrogen sulfide-releasing enzymes and the existence of a time-space gradient of hydrogen sulfide within the estrous cycle of the mouse (time axis) and to compare the expression profile of the fallopian tube ampulla and uterotubal junction (space axis). The experiments were performed on a laboratory mouse model (*Mus musculus*). The expression of hydrogen sulfide-releasing enzymes was studied by western blot. Hydrogen sulfide production was determined by colorimetry. The role of hydrogen sulfide in the fertilization process was studied by *in vitro* fertilization with hydrogen sulfide donor-treated sperm and by immunocytochemical staining of the zygotes.

The expression of the known hydrogen sulfide-releasing enzymes, i.e. cystathionine- γ -lyase (CTH), cystathionine- β -synthase (CBS), and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MPST), was detected within the ovary and fallopian tube. Any enzymes did not show statistically significant differences in estrus and diestrus expression. Moreover, analogous results were found in the spatial axis; both the fallopian tube and the uterotubal junction expressed CTH, CBS, and 3-MPST enzymes, but no statistical differences were noted. Also, this applies to the production of hydrogen sulfide by these tissues. The effect of hydrogen sulfide on the fertilization process was analyzed according to lamin B1, a paternal pronucleus development marker. The performed analysis did not confirm the influence of the hydrogen sulfide donor on the development of the zygote pronuclei.

The work showed that hydrogen sulfide is enzymatically released by the tissues of the female reproductive tract, regardless of the phase of the estrous cycle or the location in the fallopian tube. There is assumed a physiological influence of maternal-born hydrogen sulfide to sperm, which is capable of fertilization and leads to pronuclei development.

Keywords: hydrogen sulfide, hydrogen sulfide-releasing enzymes, CTH, CBS, 3-MPST, ovary, fallopian tube, zygote, IVF

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval mému konzultantovi doc. Ing. Janu Nevoralovi, Ph.D. za jeho trpělivost, ochotu a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěl poděkovat doc. Ing. Romanovi Konečnému, Ph.D., že se ujal role vedoucího předkládané diplomové práce. Mé velké díky zasluhuje i María Iniesta-Cuerda, Ph.D. za poskytnutí snímků zygot, které jsem tak v rámci této práce mohl vyhodnotit a prezentovat. Taktéž bych chtěl poděkovat Ing. Václavu Růčkovi za pomoc při detekci fázi estrálního cyklu myší.

Obsah

Úvod.....	8
1. Literární přehled.....	9
1.1 Samičí reprodukční trakt	9
1.1.1 Vaječník	9
1.1.2 Vejcovod	11
1.1.3 Děloha	11
1.2 Estrální cyklus	12
1.3 Sbližování gamet, jejich fúze a embryonální vývoj	13
1.4 Fyziologie sulfanu	18
2 Cíle práce	21
3 Materiál a metody	22
4 Výsledky	28
4.1 Sulfan-uvolňující enzymy a produkce sulfanu ve vztahu k estrálnímu cyklu.....	28
4.2 Sulfan-uvolňující enzymy a produkce sulfanu ve vejcovodu ve fázi estru	32
4.3 Úloha sulfanu v procesu oplození	36
5 Diskuse.....	40
Závěr	43
Seznam použité literatury.....	44
Seznam obrázků	52
Seznam tabulek	54
Seznam použitých zkratk.....	55

Úvod

Reprodukce je zásadním pilířem v chovu hospodářských zvířat. Vlivem šlechtění a s ním spojené rostoucí produkce jsou čím dál více časté reprodukční problémy. Proto je nezbytné věnovat reprodukčním mechanismům zvýšenou pozornost.

Tvorba a zrání gamet, oplození a časný embryonální vývoj jsou klíčové okamžiky vzniku nového jedince. V případě výskytu abnormalit v rámci gamet, embryí, ale i reprodukčního traktu je výrazně snížena pravděpodobnost oplození, vzniku prvojadra, embryonálního vývoje, nidace blastocyst a zdárného vývoje plodu. Zajištění vhodných podmínek pro úspěšnou fertilizaci a embryonální vývoj je řízeno mnoha signálními molekulami včetně gasotransmiterů.

Gasotransmitery jsou plynné molekuly, které zasahují do buněčné a tkáňové signalizace a tím ovlivňují fyziologické funkce. Málo prozkoumanou molekulou z této skupiny je sulfan. Již nyní je ale jasné, že je sulfan klíčovou molekulou v oblasti reprodukce.

Hlubší poznání funkcí gasotransmiterů vnáší do reprodukční problematiky nové světlo, díky kterému lze lépe porozumět fyziologii reprodukce a rovněž přináší možnost terapeutického využití těchto plyných molekul v oblasti reprodukce.

1. Literární přehled

1.1 Samičí reprodukční trakt

Úkolem samičího reprodukčního traktu je produkce gamet a tvorba vhodného prostředí pro oplození a následný embryonální a fetální vývoj plodu. Tyto podmínky jsou zajišťovány hned několika mechanismy, jako hormonální regulací a epiteliální výstelkou reprodukčního traktu (Chumduri a Turco, 2021) nebo například iontovými kanály (Xu et al., 2019). V rámci třídy savců je známa velká variabilita v reprodukčních strategiích, odlišnosti jsou známy v typech placenty, délce estrálního cyklu a počtu mláďat ve vrhu. Anatomie reprodukčního traktu bývá podobná (Kobayashi a Behringer, 2003). Samičí pohlavní ústrojí se skládá z vnitřních a vnějších pohlavních orgánů. Mezi vnitřní pohlavní orgány náleží vaječníky a vejcovody, děloha a pochva. Vnější pohlavní orgány jsou tvořeny poševní předsíní, vulvou a klitorisem (Sláma et al., 2015).

1.1.1 Vaječník

Vaječník je párový pohlavní orgán. Polohou jsou vaječníky situovány v kaudodorzální části břišní dutiny, kde jsou přichyceny vaječnickovým okružím (*mesovarium*), duplikaturou pobřišnice. V místě úponu okruží (*margo mesovaricus*) je situována branka, kde vstupují nervy a cévy. Povrch, který není pokryt vaječnickovým okružím je druhově specifický a je označován jako ovulační plocha (Jelínek a Jelínek, 2006; Sláma et al., 2015).

Velikost a tvar vaječnicků jsou druhově specifické, taktéž závisí na fázi pohlavního cyklu, stáří a tělesném vývoji jedince (Čollák et al., 1978; Jelínek a Jelínek, 2006; Sláma et al., 2015).

Povrch vaječnicku je pokryt jednovrstevným epitelem (*epithelium superficiale*). Pod epiteliální vrstvou se nachází kolagenní vazivová blána (*tunica albuginea*), charakteristické je pro ni bělavé zbarvení. Dřeň vaječnicku (*zona vasculosa*) obsahuje hladkosvalovou tkáň, řídké kolagenní vazivo, nervy, tepny a žíly. Korová vrstva (*zona parenchymatoza*) je tvořena vaječnickovými folikuly a vazivem, které je tvořeno fibrocyty a vazivovými vlákny. Ve vazivové vrstvě jsou rovněž přítomny buňky odpovědné za endokrinní produkci hormonů (Jelínek a Jelínek, 2006; Sláma et al., 2015).

Pohlavní buňky vznikají meiotickým dělením. Meiotické dělení je složeno ze dvou fází. Během první fáze je nejvýznamnější stádium pachytene (Profáze I),

při níž chromozómy tvoří tetrády, tzv. bivalenty (Snustad a Simmons, 2010). Tyto struktury umožňují vznik dvou-řetězcových zlomů. Při procesu opravy těchto zlomů mohou vznikat *crossing overy*. Genetická variabilita je dána právě tímto mechanismem, kdy dochází k překřížení a výměně úseků DNA mezi homologními chromozómy (Reichman et al., 2017). Výsledkem prvního meiotického dělení jsou buňky s haploidním počtem dvou chromatidových chromozómů, jejichž genetické založení není díky *crossing overům* totožné (Snustad a Simmons, 2010).

Druhé meiotické dělení je svým průběhem shodné s dělením mitotickým. Buňky produkované meiotickým dělením jsou však haploidní a díky prvnímu meiotickému dělení i geneticky unikátní (Snustad a Simmons, 2010).

Vaječnickové folikuly jsou děleny dle stupně jejich vývoje na primordiální folikuly, primární folikuly, sekundární folikuly a terciální folikuly. Primordiální folikuly obsahují primární oocyt, který je kryt dlaždicovými folikulárními buňkami (Jelínek a Jelínek, 2006). Vývoj oocytů je dle zažitého „dogmatu“ vztažen pouze do prenatalního období samice. Samice se tak rodí s omezeným počtem nezralých oocytů (Sadler, 2011). Nový pohled prezentují Johnson et al. (2004), kteří na modelu laboratorní myši zaznamenali vysoký úbytek oocytů na vaječnicích, samice by tak byla za krátkou dobu bez oocytů, to ale nekorelovalo s reprodukční periodou myši. Následný výzkum prokázal produkci oocytů i postnatálně. To autoři vysvětlují přítomností tzv. „*germ stem cells*“ ve vaječnicích, ze kterých nové oocyty vznikají.

V primárních folikulech je přítomen oocyt I. řádu, jež je chráněn vrstvou kubických, folikulárních, buněk. Vývoj folikulů je zastaven v tomto stádiu a je znovu obnoven až s nástupem pohlavní aktivity samice (Jelínek a Jelínek, 2006). Sekundární folikuly vznikají až po zahájení reprodukčního období samice. Na rozdíl od primárního folikulu je zde přítomno více vrstev folikulárních buněk. Vrstva cylindrických buněk přiléhající k oocytu se nazývá *corona radiata*. Glykoproteiny produkované touto vrstvou se podílejí na tvorbě druhého obalu, *zony pellucidy*. V průběhu vývoje folikulu je produkována folikulární tekutina, která ovlivňuje jeho růst (Sláma et al., 2015). V terciálním (Grafově) folikulu vzniká dutina s folikulární tekutinou, ta je ohraničena folikulárními buňkami, které dají vzniknout granulární vrstvě. Namnožené granulární buňky obklopují oocyt II. řádu a tvoří hrbolek prominující do prostoru folikulu. Granulární vrstva folikulu je ohraničena vazivovým obalem folikulu (*theca folliculi*). Při ovulaci dochází k prasknutí folikulu a vyplavení oocytu do nálevky vejcovodu (Jelínek a Jelínek, 2006).

Na místě Grafova folikulu se po ovulaci začíná formovat žluté tělísko. V závislosti, zda dojde ke koncepci, či nikoli, jde o žluté tělísko gravidity, nebo periodické (Jelínek a Jelínek, 2006; Sláma et al., 2015).

1.1.2 Vejcovod

Funkce vejcovodu je dopravovat ovulované oocyty z vaječníku do dělohy. Vaječník má podobu trubičky, jejíž rozměry a tvar jsou druhově odlišné. U většiny druhů má vaječník mírně meandrující charakter, u hlodavců je vejcovod svinut do klubíčka. Fixace vejcovodu je zajištěna vejcovodovým okružím, které je tvořeno stejně jako u vaječníku duplikaturou pobřišnice (Jelínek a Jelínek, 2006). Vejcovod myši je dlouhý přibližně 18 mm a je svinut do 11 závitů (Bertolin a Murphy, 2014).

Kraniálně vejcovod začíná infundibulem, nálevkovitou částí s fimbriemi, které vybíhá k vaječníku. Nejdelší fimbrií je infundibulum, napojeno na vaječník, tímto způsobem je zajištěn dosah fimbrií k vaječníku, který je nezbytný pro zachycení ovulovaného oocytu. Na infundibulum navazuje ampula vejcovodu, která volně přechází v zúženou část vejcovodu, isthmus, Isthmus je spojen s děložním rohem tzv. uterotubálním spojením (Hafez a Hafez, 2000).

Stěna vejcovodu je tvořena hladkou svalovinou, která se kaudálním směrem zesiluje. Sliznici vejcovodu pokrývá jednovrstevný cylindrický epitel, který obsahuje řasinkové a sekreční buňky. Řasinkové buňky jsou nejvíce přítomny v kraniální oblasti vejcovodu, na fimbriích, a směrem k isthmu jejich počet klesá. Řasinkové buňky jsou řízeny hormony vaječníků. Nejvyšší aktivita těchto buněk je v době ovulace, nebo krátce po ovulaci, kdy se podílejí na nasátí oocytu do ampuly vejcovodu. Společně s kontrakcemi hladké svaloviny vejcovodu zajišťují řasinkové buňky posun oocytu vejcovodem. Sekreční buňky produkují granula, jejichž počet je odlišný jak druhově, tak i v rámci estrálního cyklu. Sekreční granula se hromadí v epiteliálních buňkách a po ovulaci jsou vyloučeny do vejcovodu (Hafez a Hafez, 2000). Tekutina vejcovodu zajišťuje optimální prostředí pro kapacitaci spermií, fúzi gamet a následný preimplantační vývoj (Oliphant et al., 1984).

1.1.3 Děloha

Děloha je děložními rohy napojena na vejcovody. Děložní rohy přecházejí v děložní tělo a kaudálně je děloha zakončena děložním krčkem. V rámci druhů jsou ve stavbě dělohy známy morfologické odlišnosti; pro myši je charakteristická dvojitá děloha se dvěma samostatnými krčky, pro skot, prasata, kozy a ovce je typická dvourohá

děloha s přepážkou v děložním těle. Děložní krček je prostupný děložním kanálem jen v době říje, nebo porodu. Nепrostupnost děložního krčku v jiném období je zajištěna hladkým svalstvem a hlenem (Sláma et al., 2015).

Stěna dělohy je na povrchu tvořena perimetriem, které kryje myometriem. Vnitřní vrstvu dělohy tvoří endometrium, které obsahuje stroma, děložní žlázy a endometriální epitel, který pokrývá vnitřní stěnu dělohy. V průběhu estrálního cyklu prodělávají epitelové buňky změny a rovněž dochází ke změnám v sekreci děložních žláz. To je zajišťováno hormonální stimulací estradiolem. Stěna dělohy se přímo úměrně zvětšuje s rostoucí koncentrací estradiolu. V proestru a estru je stěna dělohy edematózní s vysokou sekreční aktivitou děložních žláz. V diestru dochází k regeneraci a děloha má oproti estru tenkou stěnu (Bertolin a Murphy, 2014).

1.2 Estrální cyklus

Reprodukční cyklus, u zvířat nazývaný jako estrální, je svými fázemi (proestrus, estrus, metestrus a diestrus) u hospodářských zvířat (Jelínek a Jelínek, 2006) a hlodavců shodný. V průběhu estrálního cyklu dochází ke změnám jak v histologické stavbě, tak i na úrovni hormonální (Caligioni, 2009). Druhové odlišnosti jsou známy i v délce estrálního cyklu; estrální cyklus krávy a prasnice trvá 21 dní, v případě ovce 17 dní (Sláma et al., 2015) a u myši 4 – 5 dní (Caligioni, 2009; Byers et al., 2012). Levine (2015) uvádí délky jednotlivých fází estrálního cyklu myši následovně: proestrus (12-14 hodin), estrus (25-27 hodin), metestrus (6-8 hodin) a diestrus (55-57 hodin).

Řízení estrálního cyklu

Průběh estrálního cyklu je řízen hormonálním způsobem. Klíčová, v průběhu regulace estrálního cyklu, je osa hypotalamus – hypofýza – vaječníky. *Gonadotropin-releasing* hormon (GnRH) produkovaný hypotalamem ovlivňuje sekreci hormonů adenohipofýzy; folikuly stimulujícího hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH). FSH ovlivňuje růst a zrání folikulů. LH hraje roli při ovulaci a následné tvorbě žlutého tělíska. Folikulem jsou produkovány estrogény, které se podílejí na zpětné regulaci GnRH. Dalším hormonem estrálního cyklu je progesteron. Tento hormon je produkován žlutým tělískem, jeho funkcí je zabraňovat růstu dalších folikulů a ochraňovat graviditu (Levine, 2015). V případě, že k oplození nedojde, dochází k regresi žlutého tělíska prostřednictvím prostaglandinu $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (Zhang et al., 2017).

Identifikace stádia estrálního cyklu

V souvislosti s experimenty týkajícími se reprodukční oblasti, kde je například potřeba pseudo-pregnančních myší, je důležitá znalost fáze estrálního cyklu, díky které může být zvýšena efektivnost produkce těchto zvířat (Byers et al., 2012). Existuje několik metod pro určení stádia estrálního cyklu, které se liší rychlostí a přesností. Nejrychlejší metodou je vizuální posouzení vzhledu pochvy. Nicméně touto metodou lze odhalit pouze proestrus nebo estrus (Champlin, et al., 1973; Byers et al., 2012). Byers et al. (2012) prezentují odlišnosti ve vzhledu pochvy v jednotlivých stádiích estrálního cyklu mezi různě zbarvenými kmeny myší a poukazují tím na možné ztížení v identifikaci fáze estrálního cyklu. Další možností jak determinovat fázi estrálního cyklu je například biochemická analýza moči (Achiraman et al., 2011) nebo měření elektrického odporu sliznice pochvy (Ramos et al., 2001). Nejpresnější metodou pro určení všech stádií estrálního cyklu je metoda vaginální cytologie (Caligioni, 2009; Byers et al., 2012).

Cytologické složení vaginálního sekretu

V průběhu estrálního cyklu dochází k odlišnostem v cytologickém složení vaginálního sekretu. Proestrus je charakteristický přítomností jaderných epiteliálních buněk ve vaginálním sekretu. Tyto buňky se vyskytují jednotlivě nebo mohou tvořit shluky. Taktéž se v sekretu může vyskytovat nižší podíl zrohovatělých buněk. V estru jsou identifikovatelné shlukovité útvary bezjaderných zrohovatělých buněk. Ve fázi metestru jsou přítomny jaderné a zrohovatělé epiteliální buňky a leukocyty. Pro fázi diestru jsou majoritními buňkami ve vaginálním sekretu leukocyty (Caligioni, 2009).

1.3 Sbližování gamet, jejich fúze a embryonální vývoj

Embryonální vývoj je zahájen splynutím samčí a samičí gamety. Tomuto kroku předchází dlouhá cesta, kdy musí být zajištěno, aby se gamety setkaly ve správný okamžik a byly oplození schopné (Feingold et al., 1968).

Exponování spermií do pohlavního ústrojí je řízeno estrálním cyklem (respektive svolností k páření v estru). Doba ovulace od začátku estru je druhově odlišná, a to platí i v rámci druhu. V případě prasnic dochází k ovulaci od začátku estru v rozmezí 10 – 58 hodin a spermie v pohlavním traktu přežívají až 38 hodin (Soede et al., 1995).

Směr pohybu spermií směrem k oocyту je řízen dvěma mechanismy. Méně přesným způsobem regulace směru pohybu spermií na delší vzdálenost je termotaxe. Autoři Bahat et al. (2003) sledovali 2 °C rozdíly v teplotách v isthmu a v ampule

vejcovodu. Rozdíl teplot byl způsoben poklesem teploty v isthmu. Přesnějším naváděním spermií na kratší vzdálenosti je chemotaxe, kdy spermie následují vysílaný chemický signál a řídí se jeho koncentrací (Ramírez-Gómez et al., 2019).

Spermie směřují do místa, kde vejcovod ústí do dutiny dělohy, tzv. uterotubálního spoje. Zde se spermie přichytávají na epitel vejcovodu, kde tvoří tzv. rezervoár spermatu (Suarez, 1987). Suarez et al. (1991) uvádějí, že jsou spermie k řasinkovému epitelu přichyceny akrozomální oblastí. V případě prasat, skotu a koní jsou známy proteiny tzv. spermadheziny se schopností vázat se na akrozomální oblast spermie a sacharidy v isthmu, tímto způsobem je zajištěno přichycení spermií ke stěně vejcovodu. V případě hlodavců byly zaznamenány pouze fragmenty genů těchto proteinů (Haase et al., 2005).

Rezervoáry spermatu byly popsány u prasat (Hunter, 1981), ovcí (Hunter a Nichol, 1983), skotu (Lefebvre et al., 1995) a myši (Suarez, 1987). Jsou známy tři funkce rezervoáru spermií. První funkcí je udržet spermie oplození schopné, dokud nedojde k ovulaci. Bylo zjištěno, že inkubace spermií s epitelem vejcovodu měla zásadní vliv na jejich motilitu a schopnost oplození oproti inkubaci spermií v médiu bez tkáně (Chian a Sirard, 1995). Druhá funkce rezervoáru spermatu je zamezit polyspermii. Tato funkce byla ověřena pokusem, kdy byla oblast rezervoáru spermatu obehita laparoskopickou inseminací do vejcovodu nad rezervoár spermií a následně byl pozorován zvýšený výskyt polyspermicky oplozených oocytů (Hunter, 1973). Poslední funkcí rezervoáru spermií je zajištění optimálního stavu spermií a zajištění načasování procesu kapacitace ve vztahu k ovulaci. Spermie s nižší hladinou Ca^{2+} iontů se snadněji vážou na epitel vejcovodu, tato hladina je ve spermiích udržována a podílí se na zabránění předčasné kapacitaci (Dobrinski et al., 1996), což je sled změn, po kterých má spermie schopnost oplodnit oocyt (Ritagliati et al., 2018).

Jedním z procesů kapacitace je hyperaktivace, díky které je spermie odpoutána z rezervoáru. Tento proces je nezbytný pro vstup spermie mukózním sekretem k oocytu a k jeho následnému oplození. Pokud spermie není hyperaktivovaná, neprostupuje mukózním hlenem tak lehce jako spermie hyperaktivovaná i přes to, že motilita spermií může být podobná, oplození touto spermií však není možné (Ezzati et al., 2014). Hyperaktivace je řízena geny skupiny CatSper, které kódují Ca^{2+} kanál specifický pouze pro spermie. K aktivaci těchto kanálů dochází alkalizací vnitrobuněčného prostředí a také působením prostaglandinu a progesteronu. Spermie

s nefunkčními geny skupiny CatSper nejsou schopny proniknout přes *zonu pellucidu* (Nishigaki et al., 2014).

Do procesu kapacitace jsou zapojeny i posttranslační modifikace jako fosforylace (Visconti et al., 1995) a acetylace (Kalebic et al., 2013; Ritagliati et al., 2018). Alfa tubulin podléhající acetylaci je přítomen v oblasti bičíku a takto modifikovaný je zodpovědný za motilitu spermií (Kalebic et al., 2013). Ritagliati et al. (2018) pozorovali zvyšující se podíl acetylovaných proteinů v průběhu kapacitace. Autoři rovněž prezentují, že hyperacetylace nekapacitovaných spermií zajišťuje hyperaktivaci. Kapacitace spermií je indukována rovněž zvýšením intracelulárního pH (Hernández-González et al., 2005) a hyperpolarizací buněčné membrány (De La Vega-Beltran et al., 2012). Zmíněné změny umožňují spermii podstoupit další krok vývoje – akrozomální reakci (Ritagliati et al., 2018).

Při akrozomální reakci se spojí vnější akrozómová membrána s plazmatickou membránou a dochází k uvolnění obsahu akrozómu (Buffone et al., 2009). Obsah akrozómu tvoří lysozomální enzymy (fosfolipáza A, arylsulfatáza, kyselá fosfatáza a proteázy), které usnadňují proces splynutí gamet (Allison a Hartree, 1970). Vnitřní membrána akrozómu se následně váže na *zonu pellucidu* (Buffone et al., 2009). Dotelem gamet je spuštěna kortikální reakce, jejímž úkolem je zabránit polyspermii (Sadler, 2011).

Spermie po průniku do oocyty postupuje mnoho změn. Dochází k výměně protaminů za histony, tento krok je iniciován díky nukleoplasminu 2 (NPM2), který je přítomen v oocyty (Inoue et al., 2011). Úloha protaminů je však významnější než pouhé ztuhnutí chromatinu pro jeho následný transport spermií do oocyty. Autoři Okada a Yamaguchi (2017) z výsledků Kimury a Yanagimachiho (1995) usuzují, že protaminy mají vliv na epigenetické přeprogramování.

Maternální a paternální prvojadro existují v zygotě odděleně až do jejich první fúze a podstupují tak i řadu změn (Okada a Yamaguchi, 2017). Aby byla zajištěna integrita prvojader, je nezbytná přítomnost jaderných obalů. Ty jsou tvořeny skupinou proteinů tzv. laminů (Paul a Fulka, 2022), které svými vazebnými místy umožňují navázání chromatinu a podílejí se tak na replikaci DNA (Benavente a Krohne, 1986). V současné době jsou známy dva odlišné typy laminů; lamin typu A a lamin typu B. Lamin typu A dává vzniknout laminu A a laminu C v závislosti na odlišné posttranskripční úpravě (Machiels et al., 1996). Lamin typu B je kódován geny *Lmnb1*

a *Lmnb2*. Zatímco *Lmnb1* kóduje lamin B1, gen *Lmnb2* kóduje lamin B2 a lamin B3 v závislosti na následném sestřihu (Paul a Fulka, 2022).

Významným krokem v průběhu vývoje prvojader je jejich epigenetická modelace. Samčí prvojádro do 4 hodin po oplození podstupuje aktivní demetylaci, zatímco samičí prvojádro si svůj metylační vzor zachovává (Santos et al., 2002). Autoři změnám v metylačním vzorci přisuzují roli v regulaci genové exprese a imprintingu.

Nidace blastocysty je dalším zásadním krokem ve zdárném vývoji embrya. V případě lidské populace je odhadováno, že téměř 75 % neúspěšných pokusů o potomka je zapříčiněno nezdárnou implantací (Norwitz et al., 2001). Pro úspěšnou implantaci je nezbytné optimální prostředí dělohy. To je zajišťováno produkcí děložní tekutiny, která hraje významnou roli v průběhu nidace embrya (Xu et al., 2019). Tato tekutina se do dělohy dostává skrze děložní sliznici za pomoci iontových kanálů. Je známo více než 14 iontových kanálů podílejících se na transportu Na^+ , K^+ , Cl^- a Ca^{2+} iontů (Ruan et al., 2014).

Základy gonád jsou znatelné 7 dní *post coitum*, kdy dochází k diferenciaci primordiálních kmenových buněk z mezodermu (Ginsburg et al., 1990). V tomto okamžiku mají gonády stále bipotenciální charakter. Kolem 11,5 dne embryonálního vývoje (E) dochází k expresi genů odpovědných za další vývoj reprodukčního traktu (Albrecht a Eicher, 2001). Jedním z nejvýznamnějších genů v diferenciaci samčích gonád je gen SRY, který je vázán na pohlavní chromozóm Y (Koopman et al., 1991). Prekurzor pro Sertoliho a granulární buňky je stejný, exprimovaný gen SRY ovlivňuje vývoj gonád směrem k Sertoliho buňkám (Albrecht a Eicher, 2001). Naopak vývoj vaječníků je iniciován transkripčním faktorem FOXL2 a proteinem BMP2. Tyto faktory se společně podílejí na regulaci exprese follistatinu (Fst), který je nezbytný pro správný vývoj vaječníků (Kashimada et al., 2011) a následně se v reprodukčním věku podílí na regulaci estrálního cyklu jako inhibitor sekrece FSH (Ueno et al., 1987).

Dalším zásadním milníkem v průběhu vývoje embrya je diferenciací vývodů pohlavních cest. Před tímto krokem jsou přítomny jak Wolfovy, tak i Müllerovy vývody. V závislosti na hormonální produkci vznikají samčí, nebo samičí pohlavní vývodné cesty. Vývoj samčích pohlavních vývodů je závislý na produkci tří testikulárních hormonů. Prvním hormonem je testosteron, který je produkován Leydigovými buňkami a díky jeho účinku dochází k rozvoji Wolfových vývodů a rozvoji genitálií. Anti-Müllerovský hormon (AMH) se podílí na regresi Müllerových vývodů a je produkován Sertoliho buňkami (Nef a Parada, 2000). Sestup varlat

do šourku je zajištěn insulin-like růstovým faktorem 3 (INSL3) (Zimmermann et al., 1999).

Vývoj samičích pohlavních orgánů je podmíněn absencí zmíněných hormonů. Bez přítomnosti testosteronu dochází k regresi Wolfových vývodů. Díky absenci AMH se mohou vyvíjet Müllerovy vývody. Nepřítomnost INSL3 zajišťuje setrvání gonád v dutině břišní (Nef a Parada, 2000). V případě nepřítomnosti samčích hormonů dochází k vývoji samičích pohlavních cest bez ohledu na genetické pohlaví plodu (Jost et al., 1970). Vývoj myši v časných stádiích embryonálního vývoje je shrnut tabulkou 1.1.

Dynamické změny v průběhu embryonálního a fetálního vývoje jsou regulovány různými molekulami. Mezi potenciální a dosud nepopsanou skupinu regulačních molekul řadíme gasotransmitery (Nevoral et al., 2016).

Tabulka 1.1: Vybraná preimplantační a implantační stádia vývoje myši (Ginsburg et al., 1990; Albrecht a Eicher, 2001; Wang a Dey, 2006; Hill, 2022).

Den embryonálního vývoje	Stádium vývoje
E 0	Ovulovaný oocyt
E 0,5	Proces oplození
E 1,0	Zygota
E 1,5	První buněčné dělení (dvoubuněčné embryo)
E 2,0	Čtyřbuněčné embryo
E 2,5	Osmibuněčné embryo
E 3,0	Morula (8 – 16 buněk)
E 4,0	Časná blastocysta (hatching)
E 4,5	Implantace
E 7,0	Zřetelné základy gonád
E 11,5	Exprese genů zodpovědných za diferenciaci gonád
~E 19,0	Narození

1.4 Fyziologie sulfanu

Sulfan je bezbarvý, zápachající plyn, který byl po staletí znám svými toxickými účinky, a to bylo také předmětem jeho výzkumu (Wang, 2012). V polovině devadesátých let minulého století se začaly objevovat studie prezentující endogenní produkci sulfanu v jednotlivých tkáních, kde plní fyziologické funkce (Abe a Kimura, 1996; Hosoki et al., 1997). Tato zjištění přiřadila sulfan ke dvěma již známým endogenně produkováným molekulám, oxidu dusnatému (NO) a oxidu uhelnatému (CO) tzv. gasotransmiterům (Wang, 2012).

Gasotransmitery jsou plynné signální molekuly, které v organismu plní své fyziologické funkce (Wang, 2002). Sulfan je dosud přehlížený gasotransmiter s univerzálním využitím v buněčné a tkáňové signalizaci, z toho důvodu lze očekávat jeho zapojení jak do gametogeneze, tak do oplození, preimplantačního (Nevoral et al., 2016) i postnatálního vývoje (Zhang et al., 2020; Testai et al., 2020).

Každá z plyných molekul interaguje se svými signálními proteiny odlišně. V případě sulfanu se jedná o S-sulfhydrataci, touto vazbou je povětšinou zvýšena aktivita modifikovaných proteinů (Mustafa et al., 2009). Cebová et al. (2016) uvádí, že mezi jednotlivými gasotransmitery může docházet k interakci; výsledný efekt tak může být zvýšen kumulativním účinkem gasotransmiterů, nebo naopak snížen v případě antagonistického účinku. Gasotransmitery zastávají v organismu protektivní funkce; podílejí se na aktivaci antioxidantů, tlumí zánětlivé účinky a aktivací antiapoptických genů se podílejí na utlumení apoptózy (Cebová et al., 2016). Kromě zmíněných třech plyných molekul by mohl plnit funkce gasotransmiteru také amoniak (NH_3) a metan (CH_4) (Wang, 2014).

Geneze sulfanu

Je známo několik způsobů produkce sulfanu. Nejstarším způsobem je bakteriální produkce. Bakterie produkují sulfan z cysteinu pomocí cystein desulfhydrázy za vzniku sulfanu, amoniaku a pyruvátu (Blachier et al., 2019).

Dále je sulfan produkován enzymatickým způsobem. I pro tyto dráhy geneze sulfanu je klíčová sirá aminokyselina cystein. Na enzymatické produkci se podílejí 3 sulfan-uvolňující enzymy, cystationin- γ -lyáza (CSE/CTH), cystationin- β -syntáza (CBS) a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (3-MPST) (Wang, 2012). Taktéž je známa neenzymatická produkce sulfanu (Yang et al., 2019).

Molekula sulfanu může po svém vzniku ihned interagovat se svými příslušnými substráty. V případě, že není přítomen fyziologický signál, který by sulfan směřoval k jeho fyziologickým reakcím, dochází k uchování sulfanu ve formě železo-sirných komplexů nebo sulfanové síry (Ogasawara et al., 1994). Vyvázání síry z železo-sirného komplexu je závislé na kyselém prostředí, proto se Ishigami et al. (2009) domnívají, že tyto komplexy nemusí tvořit fyziologický zdroj sulfanu. Sulfanová síra je složena ze dvou atomů síry. Tato vazba je labilní a reaktivní, a proto tvoří sloučeniny, například polysulfidy, thiosírany a persulfidy (Iciek et al., 2019) nebo se váže přímo na proteiny (Ogasawara et al., 1993). Sulfanová síra se podílí nejen na uchování sulfanu pro pozdější využití, ale díky vazbám s dalšími komponenty může být i v relativně stabilním stavu transportována (Wang, 2012).

Sulfan a reprodukce

Toxicita exogenního sulfanu ve vztahu k reprodukčním ukazatelům byla zkoumána z mnoha aspektů. V případě samců nebyl zjištěn vliv na motilitu spermií a ani výskyt morfologických abnormalit spermií se nelišil od normálního stavu. U samic byla hodnocena schopnost zabřeznout a početnost vrhu, rovněž nebyly pozorovány odlišnosti. Exogenní sulfan není v přiměřeném množství toxický a nikterak neovlivňuje reprodukční schopnosti jedinců (Dorman et al., 2000).

Produkcí sulfanu v reprodukčním traktu zkoumal Patel et al. (2009). Nejvíce sulfanu je produkováno v děloze, dále v plodových obalech a nejméně v placentě. Autoři rovněž zmiňují fakt, že přítomnost oxidu dusnatého zvyšuje produkci sulfanu v plodových obalech. Stejný efekt na produkci sulfanu má i anoxické prostředí.

Endogenní produkce sulfanu enzymy CBS, CTH a 3-MPST byla pozorována i v nezralých a zralých oocytech. Bylo zjištěno, že produkce sulfanu je nezbytná pro meiotické dělení; inhibicí sulfan-uvolňujících enzymů bylo meiotické dělení pozastaveno. Tato inhibice je však reverzibilní. Autoři rovněž prezentují možnost substituce sulfan-uvolňujících enzymů v produkci sulfanu (Nevoral et al., 2015).

Sulfan v reprodukčním traktu hraje mnoho významných rolí, například se podílí na modulaci proteinů iontových kanálů, a tím figuruje při optimalizaci děložního prostředí při procesu nidace embrya (Xu et al., 2019). Taktéž je znám vliv sulfanu na K^+ a Ca^{2+} iontové kanály v oocytech. Modulací jejich aktivity je zachována kvalita oocytů (Nevoral et al., 2018). Dále bylo zjištěno, že sulfan ve vejcovodu hraje významnou roli ve zdárném transportu oocytu/embrya, významná je však fyziologická

koncentrace; při vysoké nebo naopak nízké hladině sulfanu byl zaznamenán zpomalený transport embryí, což je příčinou zvýšeného počtu mimoděložních těhotenství (Ning et al., 2014).

2 Cíle práce

V praktické části této práce bylo cílem ověřit hypotézu, která předpokládá endogenní produkci sulfanu v reprodukčním traktu samice, kde vytváří časoprostorový gradient a hraje tak svou fyziologickou roli v procesu oplození. Dílčí cíle byly vytyčeny následovně:

- I) Zmapovat expresi sulfan-uvolňujících enzymů v závislosti na fázi estrálního cyklu.
- II) Vyjádřit prostorové změny v expresi sulfan-uvolňujících enzymů a porovnat expresní profil ampuly vejcovodu a uterotubálního spoje.
- III) Změřit fyziologickou produkci sulfanu v estrálním vejcovodu a otestovat jeho úlohu pro proces oplození.

3 Materiál a metody

Praktická část této práce byla vypracována pod odborným vedením doc. Ing. Jana Nevorala, Ph.D. v Laboratoři reprodukční medicíny Biomedicínského Centra a Lékařské fakulty v Plzni, Univerzita Karlova.

Chemikálie

Chemikálie použité v praktické části jsou zobrazeny v tabulce 2.1.

Tabulka 2.1: Použité chemikálie.

Název chemikálie	Výrobce	Katalog. číslo
4'6'-diamidino-2-fenylindol (DAPI)	Vector Laboratories Inc	H-1200
Anti-3-MPST protilátka	Abcam	ab224043
Anti-CBS protilátka	Abcam	ab96252
Anti-CTH protilátka	Abcam	ab80643
Anti-H3 protilátka	Abcam	ab1791
Anti-laminB1 protilátka	Abcam	ab16048
Anti-rabbit AlexaFluor 647	Abcam	ab150079
Anti- α -tubulin protilátka	Abcam	ab52866
Bovinní sérum albumin (BSA)	Sigma – Aldrich®	A7906
Falloidin	Cell Signaling technology®	13054
Fosfátem pufrovaný roztok (PBS)	Sigma – Aldrich®	P5368
Hydrogensulfid sodný (NaHS)	Sigma – Aldrich®	161527
Chlorid železitý (FeCl ₃)	Sigma – Aldrich®	F7134
Laemmli pufr	Sigma – Aldrich®	S3401
L-cystein (L-cys)	SAFC®	W32,630-5
N,N-dimethyl-p-phenylendiamin sulfát*	Sigma – Aldrich®	D4790
Octan zinečnatý (Zn-Ac)	Sigma – Aldrich®	Z0625
Parafolmaldehyd (PFA)	Sigma – Aldrich®	P6148
Polyvinyl-alkohol (PVA)	Sigma – Aldrich®	341584
Pyridoxal 5'-fosfát monohydrát (PxF)	Sigma – Aldrich®	82870
Sulfid sodný (Na ₂ S)	Sigma – Aldrich®	407410
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo scientific	34095
TBS-TW	Sigma – Aldrich®	524753
Trichloroctová kyselina (TCA)	Sigma – Aldrich®	T6399
TRIS-HCl	Abcam	ab286854
Triton X-100	Sigma – Aldrich®	93443
Tween 20	Sigma – Aldrich®	P1379

*(N,N-DMPD)

Laboratorní zvířata

Modelovým organismem pro experimentální část práce byla zvolena laboratorní myš (*Mus musculus*) kmene ICR, resp. samice ve věku 8 – 12 týdnů. Experimentální zvířata byla chována při teplotě $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, relativní vzdušné vlhkosti 60 % a světelném režimu 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Manipulace a zacházení se zvířaty bylo v souladu se Zákonem 246/1992 Sb., o ochraně zvířat proti týrání. Všechny úkony byly prováděny v rámci schváleného projektu pokusů (MSMT-249/2017-4).

Detekce stádia estrálního cyklu

Časová osa byla vyjádřena fázemi estrálního cyklu. K detekci těchto fází byla použita metoda vaginální cytologie. Výplach pochvy byl prováděn pipetou s 10 μl fyziologického roztoku. Získaný sekret byl přenesen na podložní sklíčko, po kompletaci s krycím sklíčkem byl preparát pozorován pod mikroskopem. Jednotlivá stádia estrálního cyklu, tedy proestrus, estrus, metestrus a diestrus, byla determinována na základě odlišného zastoupení buněk v sekretu, jak popisuje ve své publikaci Caligioni (2009). Pro odběr vzorků byly použity samice ve fázích I) proestrus/estrus a II) metestrus/diestrus.

Izolace tkání a příprava vzorků pro analýzy

Experimentální zvířata, ve známé fázi estrálního cyklu, byla omráčena CO_2 a následně byla usmrcena cervikální dislokací. Vaječníky společně s vejcovody byly izolovány *post mortem*, vyjmuty a přesunuty do Petriho misky s PBS. Pod stereomikroskopem byl z těchto orgánů odstraněn tuk a přebytečné vazivo. Následně byly orgány reprodukčního traktu dle potřeb jednotlivých analýz rozděleny. V případě zkoumání gradientu vaječník – vejcovod byly použity vaječníky a vejcovody, pro analýzy gradientu vejcovodu byl vejcovod rozdělen na ampulu a uterotubální spoj vejcovodu. Vzorky pro kolorimetrii byly analyzovány ihned po získání. V případě vzorků pro western blot byla tkáň homogenizována a 30 minut lyzována v pufru RIPA (150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% deoxycholát sodný, 0,1% dodecylsírán sodný, 50mM TRIS, pH 8,0). Po následné centrifugaci byl získán supernatant, který byl pro pozdější analýzu uchován při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Izolace tkání pro ověření vlivu donoru sulfanu na proces oplození je popsána v rámci protokolu *in vitro* oplození (IVF) viz dále.

Western Blot

Pro western blot byly použity předem připravené vzorky supernatantu, získané z předmětných částí reprodukčního traktu samice.

1. Vialky byly vyjmuty z mrazícího boxu a po rozmrznutí byly odstředěny v centrifuze (5 minut, 12000 otáček/min).
2. Celkový objem vzorku určený pro nanášku na gel byl stanoven na 16,5 μ l. Vzorek byl tvořen 10,5 μ l destilované vody, 1,5 μ l supernatantu a 4,5 μ l Laemmliho pufru s přidavkem 3-merkaptopyruvátu. Nanáška proteinů byla odhadnuta z hmotnosti tkáně a byla přibližně 20 μ g.
3. Připravené vzorky byly po dobu 5 minut zahřívány na 95 °C.
4. Pro elektroforézu byl použit komerční 4-15% polyakrylamidový Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gel (Bio-Rad Laboratories, Francie).
5. Hmotnostní standard a jednotlivé vzorky byly pipetovány do jamek gelu.
6. Elektroforéza byla připojena ke zdroji elektrického proudu a byly nastaveny hodnoty pro napětí (190 V), proud (50 mA), výkon (20 W) a čas (45 minut).
7. Gel byl vyjmut z plastového pouzdra a separovaný proteom byl vizualizován za pomoci kamery BIO-RAD ChemiDoc™ MP Imaging System v programu Image Lab 4.1. (Bio-Rad Laboratories, Francie).
8. Po zhodnocení screeningu byl gel přebloťován na nitrocelulózovou membránu (Trans-Blot® Turbo™; Bio-Rad Laboratories, Francie). Pro blotování byly nastaveny parametry napětí (25 V), proudu (2,5 A) a času (7 minut).
9. Membrána byla 5 minut oplachována v roztoku TBS-TW (pH 7,5).
10. Membrána byla blokována v 5% roztoku BSA po dobu 1 hodiny.
11. Primární protilátky byly ředěny v poměru 1:1 000 (v případě protilátky proti CTH v poměru 1:500) do 1% BSA. Protilátky byly připravovány pro zkoumaný enzym a rovněž pro tzv. „house keeping“ faktory (v případě této práce histon H3 a α -tubulin), ke kterým pak byla zjištěná hodnota pro zkoumaný enzym vztažena.
12. Membrána byla rozřezána na dílčí části dle molekulové hmotnosti zkoumaných proteinů.
13. Na dno Petriho misky byl přichycen parafilm na který byly jednotlivé části nitrocelulózové membrány přeneseny. Na příslušnou část membrány (dle předpokládané lokace proteinu) byla nanášena příslušná protilátka. Inkubace probíhala přes noc v humidované Petriho misce při teplotě 4 °C.
14. Části nitrocelulózové membrány byly oplachovány v TBS-TW (3x 10 minut).

-
15. Sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) byla připravována v poměru 1:13 300 v TBS-TW.
 16. Inkubace probíhala v Petriho misce na přichyceném parafilmu. Na části nitrocelulóзовé membrány byla nanесena sekundární protilátka. Inkubace probíhala 1 hodinu v humidované Petriho misce při laboratorní teplotě.
 17. Oplach po sekundární protilátce byl analogický s oplachem po primární protilátce (bod 14).
 18. Pro detekci proteinů bylo použito chemiluminiscenčního kitu (SuperSignalTM West Femto Maximum Sensitivity Substrate). Luminol s peroxidem byl smíchán v poměru 1:1. Inkubace nitrocelulóзовých membrán s tímto roztokem probíhala v Petriho misce s parafilmem po dobu 3 – 5 minut v temnu.
 19. Takto připravené membrány byly snímány kamerou BIO-RAD ChemiDocTM MP Imaging System v programu Image Lab 4.1.
 20. Denzitometrická analýza pořízených snímků byla provedena v programu Image Lab 4.1.

Kolorimetrie

Připravené tkáně vaječníků a vejcovodů byly podrobeny kolorimetrické analýze.

1. V závislosti na charakteru tkáně byly použity rozdílné postupy homogenizace. Pro vejcovody byly použity předem odvážené vialky s rezinem (ReadyPrepTM Mini Grinders; Bio-Rad Laboratories, Francie) s přidavkem 125 μ l 45mM Zn-Ac v extrakčním pufru (EB: 20mM EDTA, 50mM TRIS-HCl (pH 8,0)). Vaječnky byly přemístěny do předem odvážených vialek se skleněnými kuličkami a 250 μ l 45mM Zn-Ac v EB.
2. Vialky o známé hmotnosti byly následně opět zváženy a byla zaznamenána hmotnost analyzované tkáně.
3. Vejcovody byly homogenizovány pomocí tloučku, vaječnky za pomoci homogenizátoru.
4. Vialky s homogenizovanými tkáněmi byly lyzovány po dobu 20 minut na ledu, následně vortexovány a centrifugovány (5 minut, 12000 otáček).
5. Do 100 μ l lyzátu bylo napipetováno 4,3 μ l 50mM PxF v H₂O, 4,3 μ l 250mM L-cys v H₂O a 10,6 μ l TRIS-HCl (pH 8,8).
6. Takto připravené vzorky byly po dobu 2 hodin inkubovány v inertním prostředí (atmosféra argonu) při teplotě 37 °C.

-
7. Na posledních 30 – 60 minut inkubace byla k vzorkům přidána kalibrační řada vzorků 0-1000 μM NaHS rozpuštěného ve vodě. Složení vzorku bylo analogické jako u bodu 5, pouze s drobnou modifikací; 100 μl lyzátu bylo nahrazeno 99 μl Zn-Ac + 1 μl standardu NaHS o konkrétní koncentraci (v případě koncentrace 0 μM byl 1 μl standardu nahrazen destilovanou vodou).
 8. Následně byly lyzáty precipitovány přidavkem 20 μl TCA, vzorky byly vortexovány a centrifugovány (5 minut, 12000 otáček).
 9. Do ELISA microplate 96/F-PP destičky bylo napipetováno 100 μl vzorku, 100 μl 50mM FeCl_3 v 1,2 M HCl a 100 μl 20mM N,N-DMPD v 7,2 M HCl.
 10. ELISA destička byla uchycena do třepačky a vzorky byly 10 minut míchány.
 11. Absorbance byla měřena spektrofotometrem SYNERGY HT microplate reader, výrobce BioTek® v programu Gen5 2.06 při vlnové délce 670 nm.
 12. Zjištěné hodnoty byly vztaženy ke kalibrační křivce a přepočteny na produkci sulfanu z 1 mg tkáně/minutu.

***In vitro* fertilizace (IVF)**

Metodou IVF byla ověřována role sulfanu v procesu oplození.

1. Samci ve věku 14 týdnů byli usmrceni cervikální dislokací a následně byl odebrán ocas nadvarlete.
2. Spermie byly izolovány z ocasu nadvarlete v tzv. médiu lidské tubální tekutiny (*human tubal fluid*; HTF) s přidavkem 0,4% bovinního séra albuminu (BSA; mHTF).
3. Kapacitace spermií probíhala v 5% atmosféře CO_2 při 37 °C po dobu jedné hodiny.
4. Pokusná skupina spermií byla vystavena donoru sulfanu Na_2S o koncentraci 5 μM posledních 30 minut kapacitace.
5. V průběhu kapacitace spermií byly cervikální dislokací usmrceny hormonálně stimulované samice ve věku 8-12 týdnů. Hormonální stimulace byla provedena 5 IU eCG (*equine chorionic gonadotropin*) a 5 IU hCG (*human chorionic gonadotropin*) 72, resp. 16 hodin před usmrcením.
6. Oocyty obklopené kumulárními buňkami, tzv. kumulus-oocytární komplexy byly izolovány v mHTF.
7. Kumulus-oocytární komplexy byly po dobu 5,5 hodiny inkubovány se spermiemi v mHTF za stejných podmínek jako v případě kapacitace spermií, tj. v 5% atmosféře CO_2 při 37 °C.

8. Poté byly odstraněny zbytky kumulárních buněk a zygoty byly fixovány při laboratorní teplotě po dobu 30 minut v 4% paraformaldehydu (PFA) v PBS s přídavkem 0,1 % polyvinyl alkoholu (PVA).

9. Fixované zygoty byly uchovány při teplotě 4 °C pro další zpracování.

Imunocytochemické barvení (ICC)

Fixované zygoty vzniklé za pomoci IVF byly imunocytochemicky obarveny.

1. Zygoty byly blokovány v 1% roztoku BSA v PBS s Tweenem 20 a následně permeabilizovány v PBS s přídavkem 0,04 % Tritonu X-100 a 0,3 % Tweenu 20.

2. Zygoty byly inkubovány 1 hodinu s protilátkou pro lamin B1 (ab16048, Abcam) ředěnou v poměru 1:200 s roztokem 1% BSA v PBS s Tweenem 20.

3. Zygoty byly oplachovány v 1% roztoku BSA rozředěném v PBS s Tweenem 20.

4. Inkubace se sekundární, anti-králičí, protilátkou kompatibilní k protilátce primární (ab150079, Abcam) probíhala po dobu jedné hodiny. Protilátka byla ředěna v poměru 1:200 v 1% roztoku BSA rozředěném v PBS s Tweenem 20.

5. Následně byly zygoty promývány v 1% roztoku BSA v PBS s Tweenem 20.

6. Pro vizualizaci β -aktinu byly zygoty 15 minut inkubovány s roztokem phalloidinu (13054, Cell Signaling technology®) ředěném v poměru 1:200 s 1% BSA v PBS s Tweenem 20.

7. Poté byly zygoty opět promyty v 1% BSA v PBS s Tweenem 20.

8. Zygoty byly montovány do 4 μ l DAPI (H-1200, Vector Laboratories Inc) mezi krycí a podložní sklo. Soudržnost skel byla zajištěna bezbarvým lakem.

9. Preparáty byly skladovány při 4 °C.

Snímky a analýza obrazu

Snímky zygot byly pořízeny konfokálním mikroskopem Olympus IX83 (Olympus, Německo). Takto získané snímky byly následně analyzovány v softwaru ImageJ (NIH, USA).

Statistické hodnocení dat

Analýzy byly opakovány minimálně 3x. Každá analýza zahrnovala celkem 9 zvířat z těchto třech opakování. Zaznamenaná data byla statisticky hodnocena v programu NCSS 9. Normalita dat byla ověřována Shapiro-Wilkovým testem. V případě normálního rozdělení dat byl použit párový test, nebo dvou-výběrový t-test. Pokud data nevykazovala normální rozdělení, byl použit Wilcoxonův test nebo Kruskal-Wallisův test. Všechny testy byly prováděny na hladině významnosti $P < 0,05$.

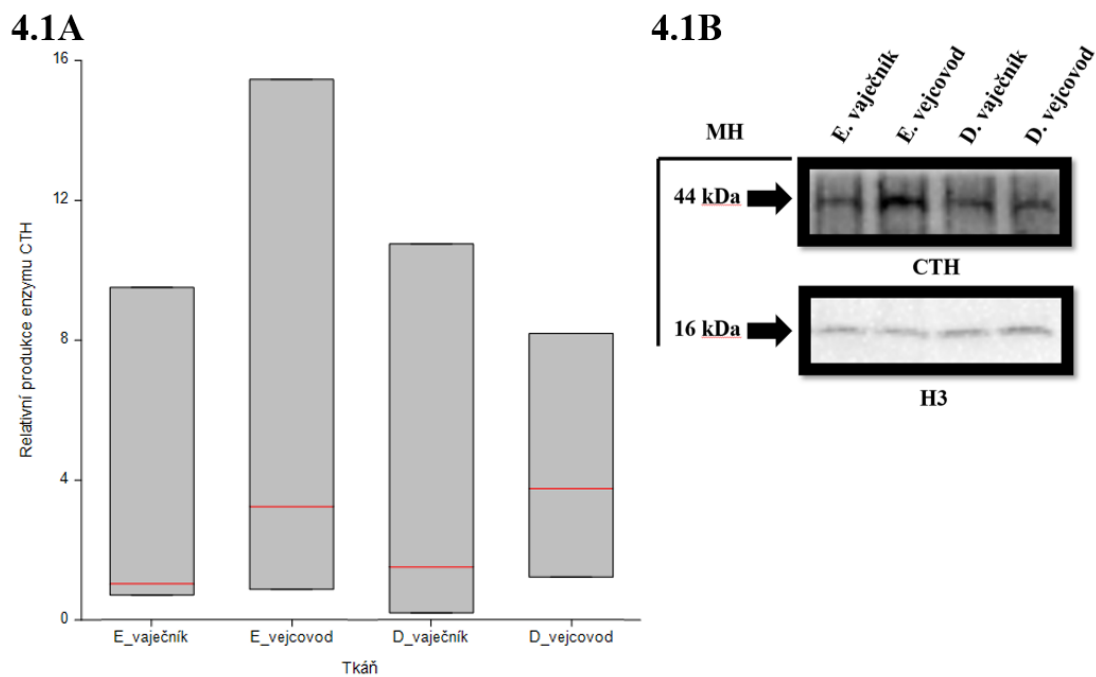
4 Výsledky

Produkce sulfanu a přítomnost sulfan-uvolňujících enzymů byla zkoumána ze dvou odlišných pohledů. První pohled byl směřován na časovou osu, kdy byla zkoumána exprese sulfan-uvolňujících enzymů a produkce sulfanu ve vaječnicích a vejcovodech v rámci estrálního cyklu. Druhý pohled byl zaměřen na prostorovou osu, tedy na přítomnost sulfan-uvolňujících enzymů a produkci sulfanu v ampule a uterotubálním spoji vejcovodu ve fázi estru. Dále byla testována role sulfanu pro proces oplození.

4.1 Sulfan-uvolňující enzymy a produkce sulfanu ve vztahu k estrálnímu cyklu

Ve vztahu k estrálnímu cyklu byly mapovány 3 známé sulfan-uvolňující enzymy – CTH, CBS a 3-MPST. Metodou western blotu a denzitometrické analýzy obrazu byly získány hodnoty exprese jednotlivých enzymů, které byly následně vztaženy ke kontrolnímu *house keeping* faktoru, v tomto případě k histonu H3. Relativní hodnoty produkce enzymů byly následně analyzovány.

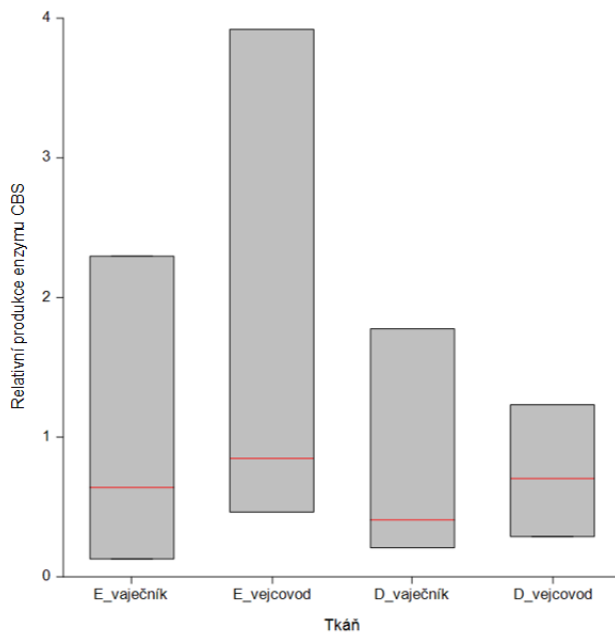
Data enzymu CTH dle Shapiro-Wilkova testu nepocházejí z normální distribuce ($W = 0,828$, $p = 0,02$). Kruskal-Wallisovým testem nebyly shledány statisticky významné odlišnosti v expresi enzymu CTH mezi analyzovanými skupinami ($H = 0,692$, $p = 0,88$). Relativní produkce enzymu CTH je prezentována na obrázku 4.1A. Reprezentativní snímek western blotu s očekávanou molekulovou hmotností CTH (44 kDa) je zobrazen na obrázku 4.1B.



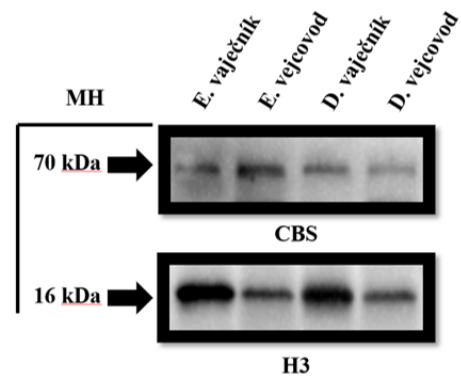
Obrázek 4.1: Boxploty prezentující relativní produkci enzymu CTH ve vaječníku a vejcovodu ve fázi estru a diestru (medián, první a třetí kvartil (interkvartilové rozpětí – IQR)) (A). Reprezentativní snímek exprese enzymu CTH ve tkáni vaječníku a vejcovodu ve fázi estru a diestru (B). MH: molekulární hmotnost; E. vaječník: vaječník ve fázi estru; E. vejcovod: vejcovod ve fázi estru; D. vaječník: vaječník ve fázi diestru; D. vejcovod: vejcovod ve fázi diestru.

Shapiro-Wilkův test zaznamenal, že data enzymu CBS nepocházejí z normální distribuce ($W = 0,797$, $p < 0,01$). Kruskal-Wallisův test nezaznamenal statisticky významné odlišnosti v expresi enzymu CBS mezi analyzovanými skupinami ($H = 1,15$, $p = 0,76$), tyto výsledky jsou demonstrovány obrázkem 4.2A. Reprezentativní snímek western blotu s očekávanou molekulovou hmotností CBS (61 kDa) je zobrazen na obrázku 4.2B.

4.2A

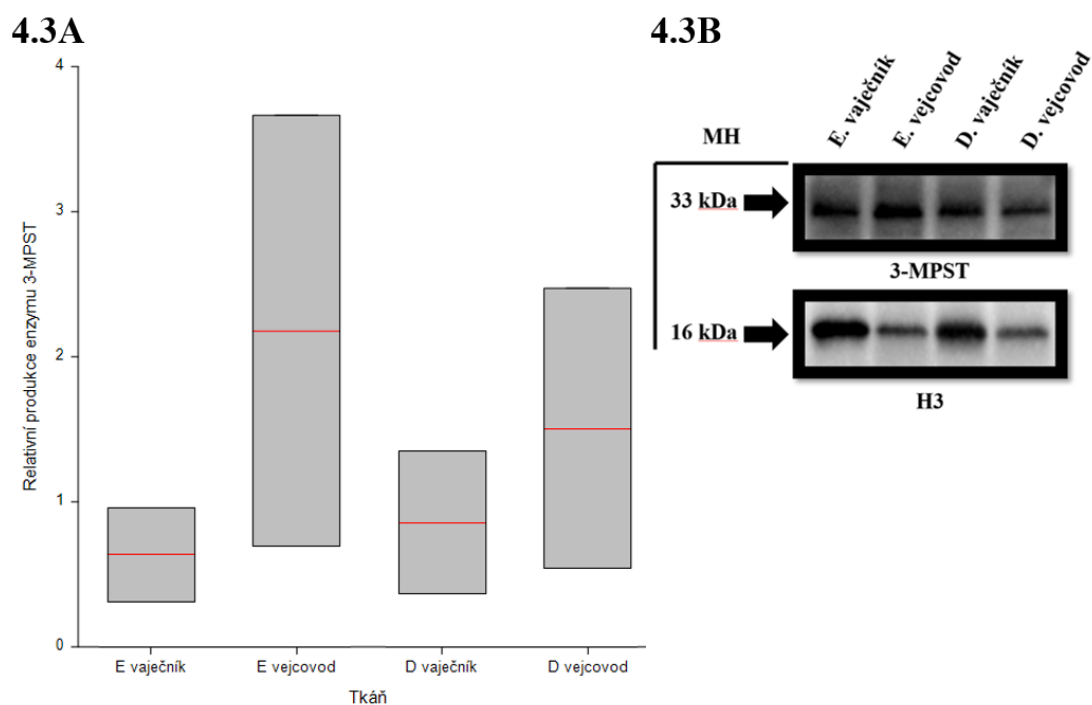


4.2B



Obrázek 4.2: Boxplots prezentující relativní produkci enzymu CBS ve vaječníku a vejcovodu ve fázi estru a diestru (medián, první a třetí kvartil (interkvartilové rozpětí – IQR)) (A). Reprezentativní snímek exprese enzymu CBS ve tkáni vaječníku a vejcovodu ve fázi estru a diestru (B). MH: molekulární hmotnost; E. vaječník: vaječník ve fázi estru; E. vejcovod: vejcovod ve fázi estru; D. vaječník: vaječník ve fázi diestru; D. vejcovod: vejcovod ve fázi diestru.

Data enzymu 3-MPST nepocházela z normální distribuce ($W = 0,822$, $p = 0,049$). Ani v tomto případě Kruskal-Wallisův test neshledal statisticky významné rozdíly v expresi enzymu tkáněmi vaječníku a vejcovodu ve fázi estru a diestru ($H = 1,67$, $p = 0,64$). Data exprese enzymu 3-MPST tkáněmi vaječníku a vejcovodu v odlišných fázích estrálního cyklu shrnuje obrázek 4.3A. Reprezentativní snímek western blotu s predikovanou molekulovou hmotností 3-MPST (33 kDa) je patrný z obrázku 4.3B.



Obrázek 4.3: Boxploty prezentující relativní produkci enzymu 3-MPST ve vaječníku a vejcovodu ve fázi estru a diestru (medián, první a třetí kvartil (interkvartilové rozpětí – IQR)) (A). Reprezentativní snímek exprese enzymu 3-MPST ve tkáni vaječníku a vejcovodu ve fázi estru a diestru (B). MH: molekulární hmotnost; E. vaječník: vaječník ve fázi estru; E. vejcovod: vejcovod ve fázi estru; D. vaječník: vaječník ve fázi diestru; D. vejcovod: vejcovod ve fázi diestru.

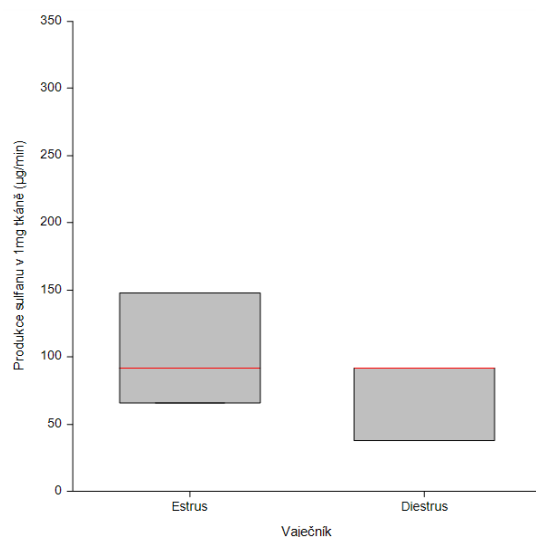
Časová osa produkce sulfanu

Z pohledu časové osy byla produkce sulfanu hodnocena ve vaječnících a vejcovodech ve fázi estru a diestru.

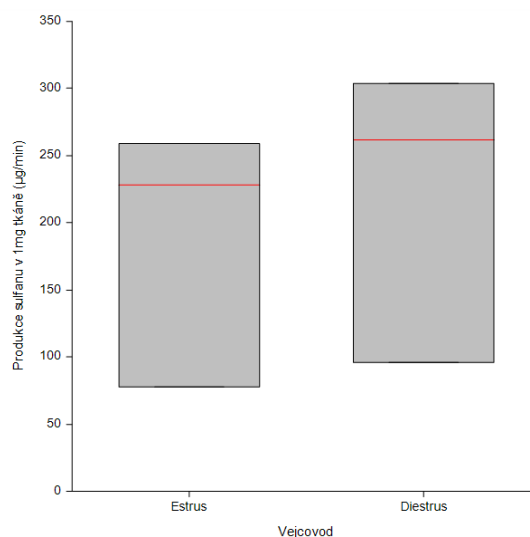
Porovnání produkce sulfanu ve vaječníku ve fázi estru a diestru bylo provedeno dvou-výběrovým t-testem. Shapiro-Wilkův test poukázal na normální rozdělení dat ($W = 0,918$, $p = 0,49$). Dvou-výběrový t-test nezaznamenal statisticky významné odlišnosti v produkci sulfanu tkáněmi vaječníku ve fázi estru a diestru ($t = -0,929$, $p = 0,41$), to je patrné z obrázku 4.4A.

Data produkce sulfanu tkáněmi vejcovodu ve fázi estru a diestru taktéž vykazovala normální rozdělení ($W = 0,851$, $p = 0,16$). Dvou-výběrový t-test neshledal rozdíly v produkci sulfanu tkáněmi vejcovodu ve fázi estru a diestru statisticky významnými ($t = 0,382$, $p = 0,72$), toto zjištění je prezentováno obrázkem 4.4B.

4.4A



4.4B

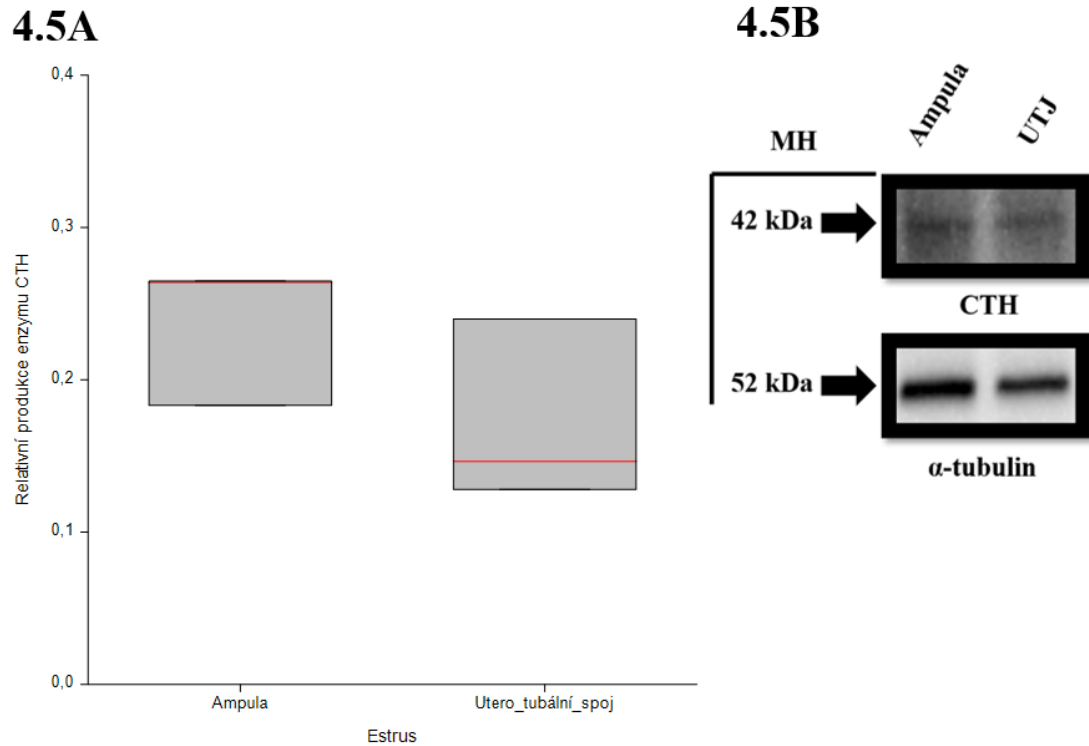


Obrázek 4.4: Boxploty prezentující produkci sulfanu v 1 mg tkáně vaječníku ($\mu\text{g}/\text{min}$) ve fázi estru a diestru (medián, první a třetí kvartil (interkvartilové rozpětí – IQR)) (A). Boxploty prezentující produkci sulfanu v 1 mg tkáně vejcovodu ($\mu\text{g}/\text{min}$) ve fázi estru a diestru (medián, první a třetí kvartil (interkvartilové rozpětí – IQR)) (B). Estrus: tkáň ve fázi estru; Diestrus: tkáň ve fázi diestru.

4.2 Sulfan-uvolňující enzymy a produkce sulfanu ve vejcovodu ve fázi estru

Sulfan-uvolňující enzymy byly mapovány v rámci vejcovodu ve fázi estru (ampula vejcovodu a uterotubální spoj) za pomoci western blotu. Zjištěné hodnoty produkce enzymů byly vztaženy ke kontrolnímu *house keeping* faktoru, v případě tohoto experimentu k α -tubulinu. Takto relativizované hodnoty enzymatické produkce byly následně statisticky testovány.

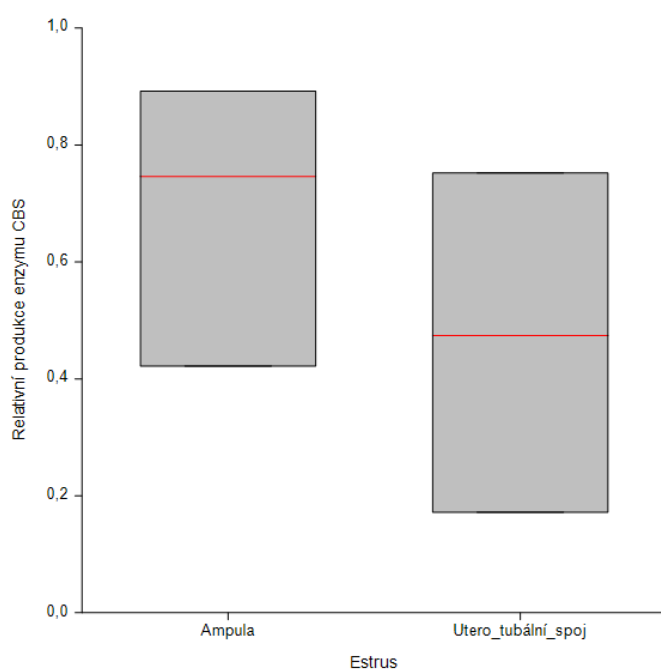
Data pořízená monitorováním enzymu CTH vykazovala normální rozdělení ($W = 0,887$, $p = 0,26$). Párovým t-testem nebyla zjištěna statisticky významná odlišnost v expresi CTH ampulou a uterotubálním spojem vejcovodu ve fázi estru ($t = -2,496$, $p = 0,24$). Relativní produkci enzymu demonstruje obrázek 4.5A. Reprezentativní snímek western blotu s predikovanou molekulovou hmotností CTH (44 kDa) je zřejmý z obrázku 4.5B.



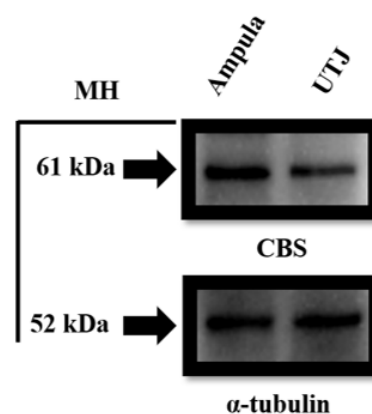
Obrázek 4.5: Boxploty demonstrující relativní produkci enzymu CTH v dílčích částech vejcovodu (medián, první a třetí kvartil (interkvartilové rozpětí – IQR)) (A). Reprezentativní snímky enzymu CTH ve tkáních vejcovodu ve fázi estru (B). MH: molekulární hmotnost; Ampula: ampula ve fázi estru; Uterotubální spoj/UTJ: uterotubální spoj ve fázi estru.

Shapiro-Wilkův test vyhodnotil, že data enzymu CBS pocházejí z normální distribuce ($W = 0,941$, $p = 0,67$). Párový t-test nezaznamenal statisticky významné rozdíly v expresi enzymu CBS ampulou a uterotubálním spojem vejcovodu ve fázi estru ($t = 1,191$, $p = 0,36$). Obrázek 4.6A znázorňuje relativní produkci enzymu CBS. Western blot ověřující přítomnost enzymu CBS s předpokládanou molekulovou hmotností (61 kDa) ve zkoumané tkáni je patrný z obrázku 4.6B.

4.6A



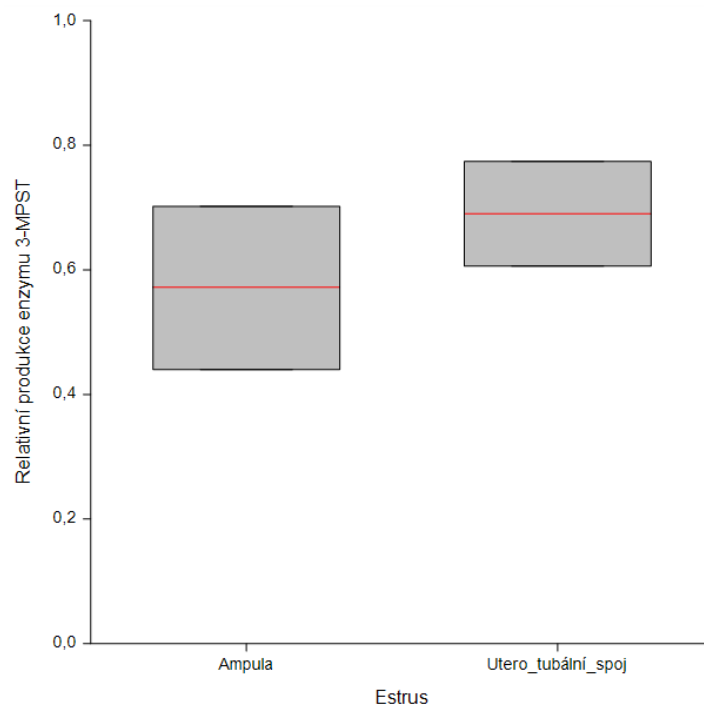
4.6B



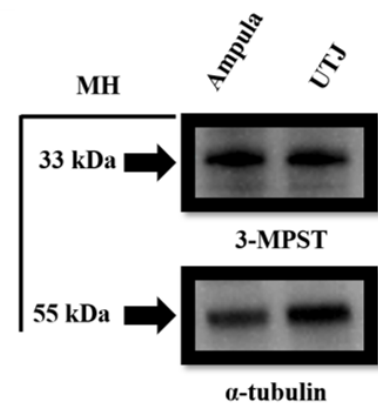
Obrázek 4.6: Boxploty zobrazující relativní produkci enzymu CBS v dílčích částech vejcovodu (medián, první a třetí kvartil (interkvartilové rozpětí – IQR)) (A). Reprezentativní snímky enzymu CBS ve tkáních estrálního vejcovodu (B). MH: molekulární hmotnost; Ampula: ampula ve fázi estru; Uterotubální spoj/UTJ: uterotubální spoj ve fázi estru.

Data zjištěná pro enzym 3-MPST pocházela dle Schapiro-Wilkova testu z normální distribuce ($W = 0,962$, $p = 0,79$). Párový t-test nezaznamenal statisticky významné odlišnosti v expresi enzymu 3-MPST mezi zkoumanými tkáněmi ($t = -2,496$, $p = 0,24$). Relativní exprese 3-MPST ampulou a uterotubálním spojem estrálního vejcovodu je patrná z obrázku 4.7A. Reprezentativní western blot znázorňující přítomnost 3-MPST s očekávanou molekulovou hmotností (33 kDa) ve tkáni vejcovodu ve fázi estru je zobrazen na obrázku 4.7B.

4.7A



4.7B

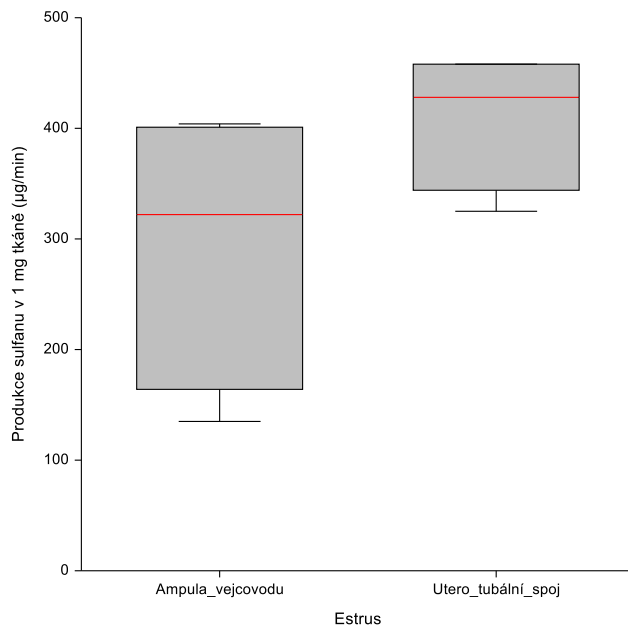


Obrázek 4.7: Boxploty zobrazující relativní expresi enzymu 3-MPST v dílčích částech vejcovodu ve fázi estru (medián, první a třetí kvartil (interkvartilové rozpětí – IQR)) (A). Repräsentativní snímky enzymu 3-MPST ve tkáních estrálního vejcovodu (B). MH: molekulární hmotnost; Ampula: ampula ve fázi estru; Uterotubální spoj/UTJ: uterotubální spoj ve fázi estru.

Prostorová osa produkce sulfanu

V rámci prostorové osy byla hodnocena produkce sulfanu v ampule vejcovodu a uterotubálním spoji vejcovodu ve fázi estru.

Zjištěná produkce sulfanu tkáněmi ampuly a uterotubálního spoje vejcovodu ve fázi estru pocházela z normální distribuce ($W = 0,869$, $p = 0,15$) Párový t-test nezaznamenal statisticky významný rozdíl v produkci sulfanu těmito tkáněmi ($t = -2,315$, $p = 0,10$). Produkce sulfanu v jednotlivých částech vejcovodu ve fázi estru zobrazuje obrázek 4.8.



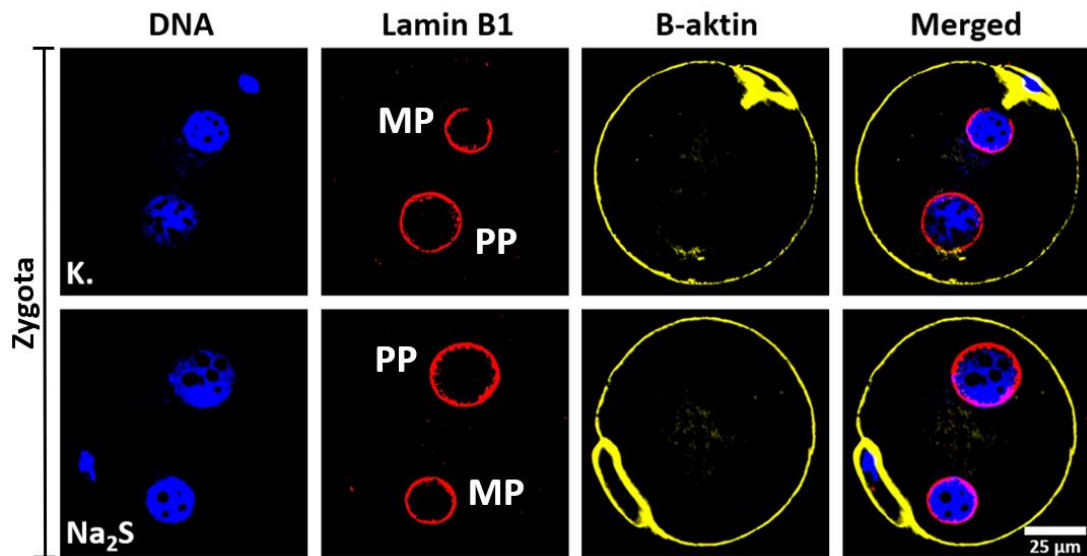
Obrázek 4.8: Boxploty demonstrující produkci sulfanu z 1 mg tkáně odlišných částí vejcovodu (medián, první a třetí kvartil (interkvartilové rozpětí – IQR)). Ampula vejcovodu: ampula vejcovodu ve fázi estru. Uterotubální spoj: uterotubální spoj ve fázi estru.

4.3 Úloha sulfanu v procesu oplození

Úloha sulfanu v procesu oplození byl zkoumán v rámci IVF. Spermie použité pro IVF byly rozděleny do dvou skupin. První skupina spermií byla ošetřena donorem sulfanu (Na_2S) ve snaze imitovat *in vivo* prostředí samičího reprodukčního traktu, kde předpokládáme účinek sulfanu produkovaného tkání vejcovodu na spermie. Druhá skupina byla kontrolní; bez jakéhokoli ošetření. Pokus obsahoval 6 opakování s celkem 24 zygotami v pokusné skupině a 29 zygotami v kontrolní skupině.

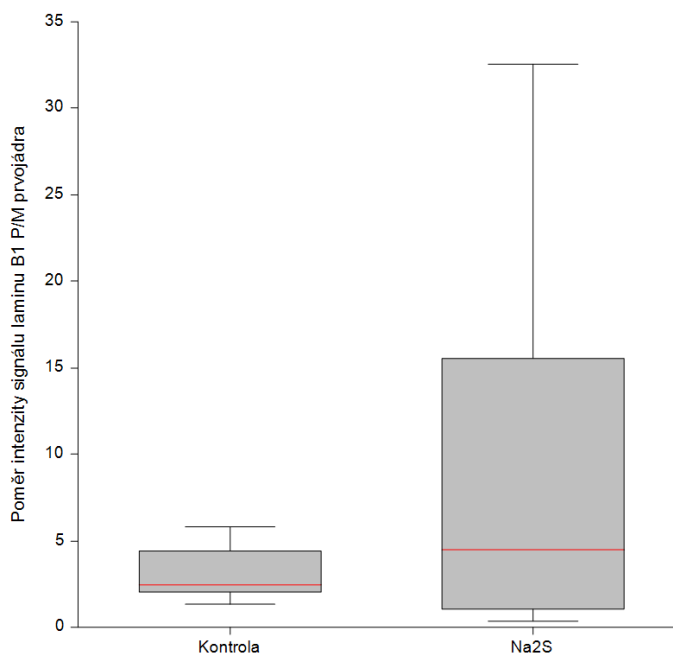
Vliv sulfanu na proces oplození byl vyhodnocen ve stádiu zygoty. Byly použity hned 3 parametry. Byla zjišťována intenzita signálu laminu B1, plocha laminu B1 v paternálním (P) a maternálním (M) prvojádre, a také rozměr paternálního prvojádra a zygoty. Ze zjištěných hodnot byl následně vyvozen poměr intenzity signálu P/M prvojádra, poměr plochy laminu B1 P/M prvojádra a poměr velikosti paternálního prvojádra k velikosti zygoty. Zjištěné poměry byly následně analyzovány.

Pro lepší představu jsou na obrázku 4.9 prezentovány reprezentativní snímky zygot kontrolní a pokusné skupiny, ze kterých je zřejmá vyrovnaná intenzita signálu laminu B1 mezi paternálními prvojádry.



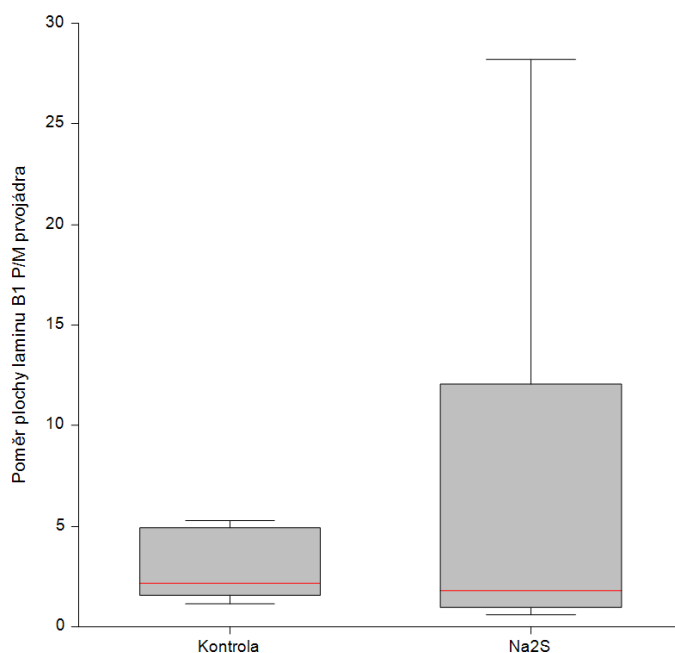
Obrázek 4.9: Reprezentativní snímky výskytu laminu B1 ve stádiu zygoty. V prvním řádku je prezentována kontrolní skupina (K); ke vzniku zygoty byla použita spermie bez ošetření. Druhý řádek zobrazuje pokusnou skupinu; ke vzniku zygoty byla použita spermie ošetřená Na_2S . V prvním, druhém a třetím sloupci jsou zobrazeny jednotlivé barevné kanály. V posledním sloupci s označením „Merged“ byly barevné kanály pro lepší vizualizaci překryvu jednotlivých vrstev sjednoceny. PP: paternální prvojádro; MP: maternální prvojádro.

Data poměru intenzity signálu laminu B1 P/M prvojádra nepocházela dle Shapiro-Wilkova testu z normální distribuce ($W = 0,61$, $p < 0,01$). Wilcoxonův test nezaznamenal statisticky významné odlišnosti mezi kontrolní a pokusnou skupinou ($Z = 0,944$, $p = 0,40$). Tyto výsledky jsou demonstrovány obrázkem 4.10.



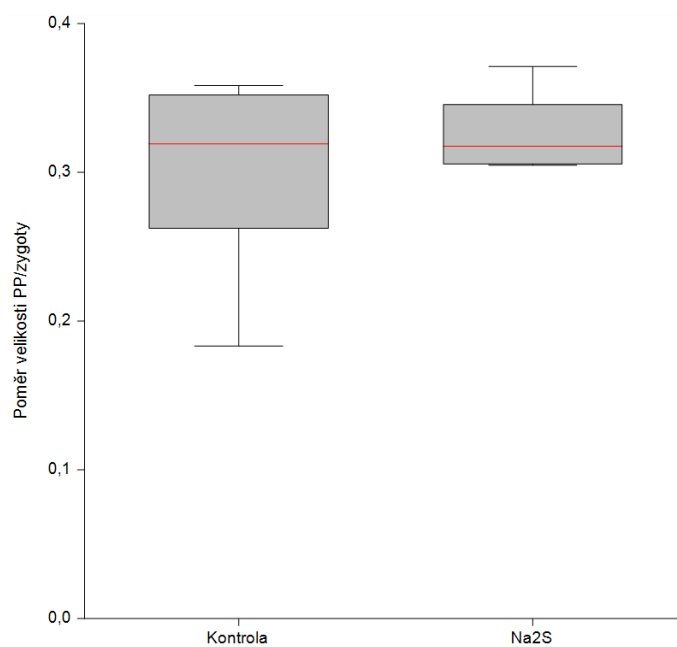
Obrázek 4.10: Boxploty zobrazující poměr intenzity signálu laminu B1 paternálního a maternálního prvojádra (medián, první a třetí kvartil (interkvartilové rozpětí – IQR)). Kontrola: kontrolní skupina; Na_2S : pokusná skupina.

Shapiro-Wilkův test vyhodnotil, že data poměru plochy laminu B1 paternálního a maternálního prvojádra nepocházejí z normální distribuce ($W = 0,54, p < 0,01$). Wilcoxonův test nezaznamenal signifikantní rozdíly mezi sledovanými skupinami ($Z = 0,524, p = 0,67$), jak zobrazuje obrázek 4.11.



Obrázek 4.11: Boxploty demonstrující poměr plochy laminu B1 paternálního a maternálního prvojádra (medián, první a třetí kvartil (interkvartilové rozpětí – IQR)). Kontrola: kontrolní skupina; Na₂S: pokusná skupina.

Ani v případě dat poměru velikosti paternálního prvojádra a zygoty Shapiro-Wilkův test nepotvrdil normální distribuci dat ($W = 0,84, p = 0,03$). Wilcoxonovým testem nebyly mezi kontrolní skupinou a skupinou Na₂S zaznamenány statisticky významné odlišnosti ($Z = 0,629, p = 0,53$). Tyto výsledky jsou znázorněny na obrázku 4.12.



Obrázek 4.12: Boxploty zobrazující poměr velikosti paternálního prvojádra a zygoty (medián, první a třetí kvartil (interkvartilové rozpětí – IQR)). Kontrola: kontrolní skupina; Na₂S: pokusná skupina.

5 Diskuse

Předkládaná práce zkoumala expresi sulfan-uvolňujících enzymů a produkci sulfanu v reprodukčním traktu samice. Tyto proměnné byly zkoumány ze dvou rovin pohledu. Byla hodnocena časová osa, kde bylo cílem porovnat expresi sulfan-uvolňujících enzymů a produkci sulfanu tkáněmi vaječníku a vejcovodu v odlišných fázích estrálního cyklu. Taktéž byla zkoumána i prostorová osa, s cílem zjistit odlišnosti v produkci sulfanu a expresi sulfan-uvolňujících enzymů jednotlivými oddíly vejcovodu ve fázi estru. Rovněž byl vyhodnocen vliv sulfanu na spermie v procesu oplození.

Sulfan-uvolňující enzymy a produkce sulfanu ve vztahu k estrálnímu cyklu

Metodou western blotu byly mapovány sulfan-uvolňující enzymy CBS, CTH a 3-MPST ve tkáních vaječníků a vejcovodů. Všechny tři enzymy byly ve tkáních exprimovány. Problematikou sulfan-uvolňujících enzymů v reprodukčním traktu se již dříve zabývalo několik studií. Přítomnost CBS a CTH ve vejcovodu prokázali Ning et al. (2014). Patel et al. (2009) potvrdili expresi enzymu CBS a CTH v děloze. Zjištění předkládané práce se tak částečně shodují s Ning et al. (2014); kromě CBS a CTH byl zjištěn i enzym 3-MPST. Zároveň tato práce rozšiřuje přehled o expresi sulfan-uvolňujících enzymů v oblasti vaječníku. Dle zjištěného expresního profilu vaječníku a vejcovodu lze předpokládat, že 3-MPST bude exprimován také v děloze.

Vyhodnocením dat nebyly prokázány statisticky významné odlišnosti v expresi enzymu CTH, CBS a 3-MPST ve vztahu k fázi estrálního cyklu. Z výsledků je tedy patrné, že jsou enzymy exprimovány ve tkáních vaječníku a vejcovodu ve vztahu k estrálnímu cyklu v podobných hladinách. Ve vaječníku jsou sulfan-uvolňující enzymy exprimovány v granulárních buňkách (Estienne et al., 2019). Ning et al. (2014) prezentují v rámci epitelu vejcovodu všudypřítomnou expresi enzymů CTH a CBS. Sulfan-uvolňující enzymy jsou exprimovány i v hladkosvalových buňkách vejcovodu (Srilatha et al., 2009). Všechny tři enzymy vykazovaly vyšší expresi ve vejcovodu než ve vaječníku, bez ohledu na estrální cyklus. Tato zjištění by mohla poukazovat na různou expresní aktivitu jednotlivých buněk.

Shodně s tkáněmi, ve kterých byly monitorovány sulfan-uvolňující enzymy, byla hodnocena i produkce sulfanu. Statistickou analýzou dat nebyly zjištěny odlišnosti v produkci sulfanu v průběhu estrálního cyklu. Konstantní hladina sulfanu bez ohledu na lokalizaci a estrální cyklus napovídá, že by sulfan-uvolňující enzymy mohly plnit

roli *house keeping* faktorů. Sulfan-uvolňující enzymy jsou patrně důležité pro udržení soustavné hladiny sulfanu v lumen vejcovodu, která ovlivňuje motilitu hladkosvalových buněk (Ning et al., 2014).

Sulfan-uvolňující enzymy a produkce

Vejcovod ve fázi estru je klíčovým místem, kde dochází ke střetu gamet, oplození a časnému preimplantačnímu vývoji (Hill, 2022), proto bylo další pozorování směřováno právě na tuto tkáň. Expres sulfan-uvolňujících enzymů byla monitorována analogicky s expresí sulfan-uvolňujících enzymů ve vztahu k estrálnímu cyklu. Naše zjištění potvrzují expresi všech tří sulfan-uvolňujících enzymů v estrálním i diestrálním vejcovodu. Pozorování proto bylo zaměřeno na dílčí části vejcovodu, tj. ampulu a uterotubální spoj. V těchto místech dochází k oplození, resp. kapacitaci spermií. Ampula i uterotubální spoj vykazovali expresi všech tří sulfan-uvolňujících enzymů, nicméně ani jeden z enzymů nevykazoval statisticky významné odlišnosti v expresi mezi zmíněnými částmi vejcovodu. Ze vzájemného porovnání expresních profilů ampuly vejcovodu a uterotubálního spoje je zřejmé, že se na fyziologické produkci sulfanu podílí každý ze zmíněných enzymů odlišnou měrou. Tento fakt zmiňují i autoři Nevoral et al. (2015), kteří navíc uvádějí, že se mohou jednotlivé enzymy v produkci sulfanu zastupovat.

Naše sledování konstantní exprese enzymů potvrzuje také měření produkce sulfanu, která byla rovněž v celém průběhu vejcovodu konstantní. Podobně se produkce sulfanu neliší v čase s různou fází estrálního cyklu.

Možné vysvětlení téměř shodné exprese sulfanu v tkáních vejcovodu lze vyvodit z výsledků autorů Ning et al. (2014), kteří prezentují vliv sulfanu na zdárný transport embryí vejcovodem. Pro optimální transport embryí je nezbytná přítomnost sulfanu, který zajišťuje kontraktilitu hladké svaloviny vejcovodu. Protože k implantaci dochází ve 4. – 5. dni embryonálního vývoje (Hill, 2022) a významná část vývoje a transportu probíhá ve vejcovodu, je nezbytné zajistit vhodné prostředí pro transport embrií dotací sulfanu i mimo estrální fázi cyklu. Lze předpokládat, že právě v době sestupu embrya je potřeba produkce sulfanu zvýšená, kdy inhibice sulfan-uvolňujících enzymů potlačuje motilitu vejcovodů a tak i sestup embrya (Ning et al., 2014).

Úloha sulfanu pro proces oplození

Vliv sulfanu na proces oplození byl zkoumán na základě odlišné inkubace spermií pro účely IVF. Spermie byly rozděleny do dvou odlišných skupin. Pokusná skupina byla ošetřena donorem sulfanu Na_2S po dobu jedné hodiny, kontrolní skupina sulfanu vystavena nebyla. Následně byly spermie použity pro IVF. Zygoty byly imunocytochemicky obarveny a po pořízení snímků analyzovány.

Vyhodnocení vlivu sulfanu na proces oplození bylo vztaženo k laminu B1, který tvoří vláknité struktury intermediárních filament a je situován pod jadernou membránu prvojader (Borsos et al., 2019). Dle hypotézy by se měl sulfan podílet na časnějším vývoji prvojader; prvojádra spermií ošetřených sulfanem by tedy měla obsahovat více laminu B1 a měla by být větší oproti prvojádřům kontrolní skupiny.

Vliv sulfanu na proces oplození byl hodnocen z několika ohledů: poměr signálu paternálního a maternálního prvojádra, poměr plochy laminu B1 paternálního a maternálního prvojádra a poměr velikosti paternálního prvojádra a zygoty. Ani v jednom případě nebyly zaznamenány statisticky významné odlišnosti mezi kontrolní a pokusnou skupinou.

Tyto výsledky naznačují, že ošetření spermií donorem sulfanu neovlivňuje dynamiku tvorby prvojader po oplození. Zároveň *in vitro* ošetření potvrzují, že signalizace sulfanem je fyziologická, protože pokud by sulfan působil striktně jako toxin (Seydi, et al. 2022), zygoty by se nevyvinuly. Výsledky této práce potvrzují fyziologickou úlohu sulfanu v reprodukci, což je v souladu s dříve publikovanými poznatky (Ning et al., 2014; Nevorál et al., 2018; Xu et al., 2019). Nicméně, plné pochopení úlohy sulfanu a využití jeho exogenních donorů v léčbě neplodnosti či plemenitbě hospodářských zvířat vyžaduje další intenzivní studium.

Závěr

Sulfan jako gasotransmitter je v současné době málo prostudovanou regulační molekulou s širokým polem působnosti. V oblasti reprodukce je sulfan významnou molekulou (Nevoral et al., 2016; Xu et al., 2019), ale jeho úloha v procesu oplození není dosud plně pochopena. Proto byla stanovena hypotéza, která předpokládala endogenní produkci sulfanu pomocí příslušných enzymů v reprodukčním traktu samice, kde by tvořil časoprostorový gradient a plnil fyziologickou roli v procesu oplození.

V rámci časové osy byla zjištěna exprese všech tří sulfan-uvolňujících enzymů, CTH, CBS, 3-MPST, ve vaječnicích a vejcovodech ve fázi estru i diestru. Expresе zmíněných enzymů se mezi fázemi estrálního cyklu statisticky významně nelišila. Taktéž byla zjišťována produkce sulfanu ve vaječnicích a vejcovodech ve fázi estru a diestru. Ani v tomto případě nebyly zaznamenány statisticky významné odlišnosti v produkci sulfanu mezi fázemi estru a diestru.

Z hlediska prostorové osy byla monitorována exprese sulfan-uvolňujících enzymů v ampule a uterotubálním spoji vejcovodu ve fázi estru. Expresе enzymů byla analogická s časovou osou a odlišnosti rovněž nebyly statisticky průkazné. Produkce sulfanu ampulou a uterotubálním spojením nevykazovala statisticky významné odlišnosti.

Úloha sulfanu v procesu oplození byla hodnocena pomocí markeru jaderné membrány prvojader, laminu B1, a velikosti paternálního prvojádra. Ve všech případech nebyly shledány statisticky významné rozdíly mezi kontrolní a pokusnou skupinou a lze konstatovat, že dynamika vývoje prvojader není ošetřením spermií donorem sulfanu ovlivněna.

V rámci této práce byla prokázána konstantní exprese sulfan-uvolňujících enzymů a produkce sulfanu ve vaječniku a vejcovodu samice myši. Produkce sulfanu nevytváří časový ani prostorový gradient v reprodukčním traktu samice. *In vitro* model ošetření spermií donorem sulfanu potvrdil fyziologickou úlohu sulfanu v procesu oplození, přestože nebyly pozorovány změny v dynamice tvorby prvojader.

Sulfan zjevně sehrává úlohu signální molekuly v procesech reprodukce. Další studium je potřebné k prokázání nezbytnosti sulfanu v průběhu dalšího časného embryonálního vývoje.

Seznam použité literatury

- Abe, K. a Kimura, H. (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of Neuroscience*, 16(3):1066–1071.
- Achiraman, S. et al. (2011). Biochemical analysis of female mice urine with reference to endocrine function: A key tool for estrus detection. *Zoological Science*, 28(8): 600–605.
- Albrecht, K. H. a Eicher, E. M. (2001). Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Developmental Biology*, 240(1):92–107.
- Allison, A. C. a Hartree, E. F. (1970). Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *Reproduction*, 21(3):501–515.
- Bahat, A. et al. (2003). Thermotaxis of mammalian sperm cells: a potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nature Medicine*, 9(2):149–150.
- Benavente, R. a Krohne, G. (1986). Involvement of nuclear lamins in postmitotic reorganization of chromatin as demonstrated by microinjection of lamin antibodies. *The Journal of Cell Biology*, 103(5):1847–1854.
- Bertolin, K. a Murphy, B. D. (2014). Reproductive tract changes during the mouse estrous cycle. In: Croy, A. B., Yamada, A. T., DeMayo, F. J. a Lee Adamson, S. (Eds.), *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. Academic Press, pp. 85–94. ISBN 978-0-12-394445-0.
- Blachier, F. et al. (2019). Cysteine-derived hydrogen sulfide and gut health: a matter of endogenous or bacterial origin. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 22(1):68–75.
- Borsos, M. et al. (2019). Genome–lamina interactions are established de novo in the early mouse embryo. *Nature*, 569(7758):729–733.
- Buffone, M. G. et al. (2009). Acrosomal exocytosis of mouse sperm progresses in a consistent direction in response to zona pellucida. *Journal of Cellular Physiology*, 220(3):611–620.
- Byers, S. L. et al. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One*, 7(4):e35538.
-

Caligioni, C. S. (2009). Assessing reproductive status/stages in mice. *Current Protocols in Neuroscience*, 48:A.4I.1–A.4I.8.

Cebová, M. et al. (2016). Cardiovascular effects of gasotransmitter donors. *Physiological Research*, 65(3):291–307.

Čollák, D. et al. (1978). *Morfologie hospodářských zvířat, část II*. Druhé vydání. Státní pedagogické nakladatelství, n. p., Praha. ISBN 17-366-77.

De La Vega-Beltran, J. L. et al. (2012). Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 287(53):44384–44393.

Dobrinski, I. et al. (1996). Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro. *Biology of Reproduction*, 54(4):783–788.

Dorman, D.C. et al. (2000). Fertility and developmental neurotoxicity effects of inhaled hydrogen sulfide in Sprague-Dawley rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 22(1):71–84.

Estienne, A. et al. (2019). The endogenous hydrogen sulfide generating system regulates ovulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 138:43–52.

Ezzati, M. et al. (2014). Tubal transport of gametes and embryos: a review of physiology and pathophysiology. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31(10):1337–1347.

Feingold, D. et al. (1968). Research in fertility regulation. *New England Journal of Medicine*, 279(7):364–370.

Ginsburg, M. et al. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, 110(2):521–528.

Haase, B. et al. (2005). Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene*, 352:20–29.

Hafez, B. a Hafez, E. S. (2000). Anatomy of female reproduction. In: Hafez, B. a Hafez, E. S. (Eds.), *Reproduction in Farm Animals*. 7th Edition. Academic Press, pp. 13–29. ISBN 0-683-30577-8.

Hernández-González, E. O. et al. (2005). Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9):5623–5633.

-
- Hill, M. A. (2022). Mouse development. [online] Embryology [cit. 10. 4. 2022]. Dostupné z: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Mouse_Development
- Hosoki, R. et al. (1997). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(3):527–531.
- Hunter, R. H. F. (1973). Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology*, 183(1):57–62.
- Hunter, R. H. F. (1981). Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *Reproduction*, 63(1):109–117.
- Hunter, R. H. F. a Nichol, R. (1983). Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *Journal of Experimental Zoology*, 228(1):121–128.
- Champlin, A. K. et al. (1973). Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. *Biology of Reproduction*, 8(4):491–494.
- Chian, R. C. a Sirard, M. A. (1995). Fertilizing ability of bovine spermatozoa cocultured with oviduct epithelial cells. *Biology of Reproduction*, 52(1):156–162.
- Chumduri, C. a Turco, M. Y. (2021). Organoids of the female reproductive tract. *Journal of Molecular Medicine*, 99(4):531–553.
- Iciek, M. et al. (2019). Sulfane sulfur - new findings on an old topic. *Acta Biochimica Polonica*, 66(4):533–544.
- Inoue, A. et al. (2011). Involvement of mouse nucleoplasmin 2 in the decondensation of sperm chromatin after fertilization. *Biology of Reproduction*, 85(1):70–77.
- Ishigami, M. et al. (2009). A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(2):205–214.
- Jelínek, F. a Jelínek, K. (2006). *Morfologie hospodářských zvířat*. Druhé vydání. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice. ISBN 80-7040-845-6.
- Johnson, J. et al. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 428(6979):145–150.
-

-
- Jost, A. et al. (1970). Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 259(828):119–131.
- Kalebic, N. et al. (2013). α TAT1 is the major α tubulin acetyltransferase in mice. *Nature Communications*, 4(1):1–10.
- Kashimada, K. et al. (2011). FOXL2 and BMP2 act cooperatively to regulate *Follistatin* gene expression during ovarian development. *Endocrinology*, 152(1):272–280.
- Kimura, Y. a Yanagimachi, R. (1995). Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development*, 121(8):2397–2405.
- Kobayashi, A. a Behringer, R. R. (2003). Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nature Reviews Genetics*, 4(12):969–980.
- Koopman, P. et al. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, 351(6322):117–121.
- Lefebvre, R. et al. (1995). Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. *Biology of Reproduction*, 53(5):1066–1074.
- Levine, J. E. (2015). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Plant, M. T. a Zeleznik, A. J. (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 4th Edition. Academic Press, pp. 1199–1257. ISBN 978-0-12-397175-3.
- Machiels, B. M. et al. (1996). An alternative splicing product of the Lamin A/C gene lacks exon 10. *Journal of Biological Chemistry*, 271(16):9249–9253.
- Mustafa, A. K. et al. (2009). H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Science Signaling*, 2(96):ra72.
- Nef, S. a Parada, L. F. (2000). Hormones in male sexual development. *Genes & Development*, 14(24):3075–3086.
- Nevoral, J. et al. (2015). Endogenously produced hydrogen sulfide is involved in porcine oocyte maturation in vitro. *Nitric Oxide*, 51:24–35.
-

-
- Nevoral, J. et al. (2016). Gasotransmitters in gametogenesis and early development: holy trinity for assisted reproductive technology—a review. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 1730750.
- Nevoral, J. et al. (2018). Involvement of K^+_{ATP} and Ca^{2+} channels in hydrogen sulfide-suppressed ageing of porcine oocytes. *Biological research*, 51(1):38.
- Ning, N. et al. (2014). Dysregulation of hydrogen sulphide metabolism impairs oviductal transport of embryos. *Nature Communications*, 5:4107.
- Nishigaki, T. et al. (2014). CatSper in male infertility. In: Weiss, N. a Koschak, A. (Eds.), *Pathologies of Calcium Channels*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 713–728. ISBN 978-3-642-40282-1.
- Norwitz, E. R. et al. (2001). Implantation and the survival of early pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 345(19):1400–1408.
- Ogasawara, Y. et al. (1993). Determination of bound sulfur in serum by gas dialysis/high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 215(1):73–81.
- Ogasawara, Y. et al. (1994). Tissue and subcellular distribution of bound and acid-labile sulfur, and the enzymic capacity for sulfide production in the rat. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 17(12):1535–1542.
- Okada, Y. a Yamaguchi, K. (2017). Epigenetic modifications and reprogramming in paternal pronucleus: sperm, preimplantation embryo, and beyond. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(11):1957–1967.
- Oliphant, G. et al. (1984). Immunocytochemical localization and determination of hormone-induced synthesis of the sulfated oviductal glycoproteins. *Biology of Reproduction*, 31(1):165–174.
- Patel, P. et al. (2009). The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7:10.
- Paul, J. C. a Fulka, H. (2022). Nuclear lamins: Key proteins for embryonic development. *Biology*, 11(2):198.
-

-
- Ramírez-Gómez, H. V. et al. (2019). Analysis of sperm chemotaxis. In: Hamdoun, A. a Foltz, K. (Eds.), *Echinoderms Part B*. Svazek 151, Academic Press, United States, pp. 473–486. ISBN 978-0-12-817072-4.
- Ramos, S. D. et al. (2001). An inexpensive meter to measure differences in electrical resistance in the rat vagina during the ovarian cycle. *Journal of Applied Physiology*, 91(2):667–670.
- Reichman, R. et al. (2017). Prophase I: Preparing chromosomes for segregation in the developing oocyte. In Arur, S. (Eds.), *Signaling-Mediated Control of Cell Division: From Oogenesis to Oocyte-to-Embryo Development*. Springer, Cham, pp. 125-173. ISBN 978-3-319-44820-6.
- Ritagliati, C. et al. (2018). Lysine acetylation modulates mouse sperm capacitation. *Scientific Reports*, 8:13334.
- Ruan, Y. C. et al. (2014). Ion channels in the endometrium: regulation of endometrial receptivity and embryo implantation. *Human Reproduction Update*, 20(4):517–529.
- Sadler, T. W. (2011). *Langmanova lékařská embryologie*. Desáté vydání. Grada Publishing a.s., Praha. ISBN 978-80-247-2640-3.
- Santos, F. et al. (2002). Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Developmental Biology*, 241(1):172–182.
- Seydi, E. et al. (2022). Toxicity of hydrogen sulfide on rat brain neurons. *Drug Research*, 72(4):197-202.
- Sláma, P. et al. (2015). *Morfologie a fyziologie hospodářských zvířat*. První vydání. Mendelova univerzita v Brně, Brno. ISBN 987-80-7509-337-0.
- Snustad, D. P. a Simmons, M. J. (2010). *Principles of genetics*. 5th edition. John Wiley & Sons. ISBN 978-0470398425.
- Soede, N. M. et al. (1995). Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *Reproduction*, 104(1):99–106.
- Srilatha, B. et al. (2009). Initial characterization of hydrogen sulfide effects in female sexual function. *The journal of sexual medicine*, 6(7):1875–1884.
-

-
- Suarez, S. (1987). Sperm transport and motility in the mouse oviduct: Observations in situ. *Biology of Reproduction*, 36(1):203–210.
- Suarez, S. et al. (1991). Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct in vitro: Possible role in formation of a sperm reservoir. *Biology of Reproduction*, 44(6):998–1004.
- Testai, L. et al. (2020). Role of hydrogen sulfide in cardiovascular ageing. *Pharmacological Research*, 160:105125.
- Ueno, N. et al. (1987). Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(23):8282–8286.
- Visconti, P. E. et al. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121(4):1129–1137.
- Wang, H. a Dey, S. K. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Reviews Genetics*, 7(3):185–199.
- Wang, R. (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB journal*, 16(13):1792–1798.
- Wang, R. (2012). Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiological Reviews*, 92(2):791–896.
- Wang, R. (2014). Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(5):227–232.
- Xu, J. W. et al. (2019). The gasotransmitter hydrogen sulfide inhibits transepithelial anion secretion of pregnant mouse endometrial epithelium. *Nitric Oxide*, 90:37–46.
- Yang, J. et al. (2019). Non-enzymatic hydrogen sulfide production from cysteine in blood is catalyzed by iron and vitamin B6. *Communications Biology*, 2:194.
- Zhang, J. et al. (2020). Hydrogen sulfide is a regulator of mammary gland development in prepubescent female mice. *Molecular Medicine Reports*, 22(5):4061–4069.
- Zhang, X. et al. (2017). Progesterone down-regulates SLIT/ROBO expression in mouse corpus luteum. *Acta Histochemica*, 119(7):740–746.
-

Zimmermann, S. et al. (1999). Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. *Molecular endocrinology*, 13(5):681–691.

Seznam obrázků

Obrázek 4.1A: Boxploty prezentující relativní produkci enzymu CTH ve vaječníku a vejcovodu ve fázi estru a diestru.....	29
Obrázek 4.1B: Reprezentativní snímek exprese enzymu CTH ve tkáni vaječníku a vejcovodu ve fázi estru a diestru.....	29
Obrázek 4.2A: Boxploty prezentující relativní produkci enzymu CBS ve vaječníku a vejcovodu ve fázi estru a diestru.....	30
Obrázek 4.2B: Reprezentativní snímek exprese enzymu CBS ve tkáni vaječníku a vejcovodu ve fázi estru a diestru.....	30
Obrázek 4.3A: Boxploty prezentující relativní produkci enzymu 3-MPST ve vaječníku a vejcovodu ve fázi estru a diestru.....	31
Obrázek 4.3B: Reprezentativní snímek exprese enzymu 3-MPST ve tkáni vaječníku a vejcovodu ve fázi estru a diestru.....	31
Obrázek 4.4A: Boxploty prezentující produkci sulfanu v 1 mg tkáně vaječníku ($\mu\text{g}/\text{min}$) ve fázi estru a diestru.....	32
Obrázek 4.4B: Boxploty prezentující produkci sulfanu v 1 mg tkáně vejcovodu ($\mu\text{g}/\text{min}$) ve fázi estru a diestru.....	32
Obrázek 4.5A: Boxploty demonstrující relativní produkci enzymu CTH v dílčích částech vejcovodu.....	33
Obrázek 4.5B: Reprezentativní snímky enzymu CTH ve tkáních vejcovodu ve fázi estru.....	33
Obrázek 4.6A: Boxploty zobrazující relativní produkci enzymu CBS v dílčích částech vejcovodu.....	34
Obrázek 4.6B: Reprezentativní snímky enzymu CBS ve tkáních estrálního vejcovodu.....	34
Obrázek 4.7A: Boxploty zobrazující relativní expresi enzymu 3-MPST v dílčích částech vejcovodu ve fázi estru.....	35
Obrázek 4.7B: Reprezentativní snímky enzymu 3-MPST ve tkáních estrálního vejcovodu.....	35
Obrázek 4.8: Boxploty demonstrující produkci sulfanu z 1 mg tkáně odlišných částí vejcovodu.....	36
Obrázek 4.9: Reprezentativní snímky výskytu laminu B1 ve stádiu zygoty.....	37

Obrázek 4.10: Boxploty zobrazující poměr intenzity signálu laminu B1 paternálního a maternálního prvojádra.....	37
Obrázek 4.11: Boxploty demonstrující poměr plochy laminu B1 paternálního a maternálního prvojádra.....	38
Obrázek 4.12: Boxploty zobrazující poměr velikosti paternálního prvojádra a zygoty.....	39

Seznam tabulek

Tabulka 1.1: Vybraná preimplantační a implantační stádia vývoje myši.....17

Tabulka 2.1: Použité chemikálie.....22

Seznam použitých zkratek

3-MPST	3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza
AMH	anti-Müllerovský hormon
BSA	bovinní sérum albumin
CBS	cystationin- β -syntáza
CSE/CTH	cystationin- γ -lyáza
DAPI	4'6'-diamidino-2-fenylindol
E	den embryonálního vývoje
eCG	<i>equine chorionic gonadotropin</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FeCl ₃	chlorid železitý
FSH	folikuly stimulující hormon
GnRH	<i>gonadotropin-releasing</i> hormon
hCG	<i>human chorionic gonadotropin</i>
HTF	<i>human tubal fluid</i>
HTF	human tubal fluid médium
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
LH	luteinizační hormon
M	maternální
N,N-DMPD	N,N-dimethyl-p-phenylendiamin sulfát
Na ₂ S	sulfid sodný
NaHS	hydrogensulfid sodný
P	paternální
PBS	fosfátem pufovaný roztok
PFA	paraformaldehyd
PGF _{2α}	prostaglandin F _{2α}
PVA	polyvinyl-alkohol
PxF	pyridoxal 5'-fosfát monohydrát
TCA	trichlorostová kyselina
Zn-Ac	octan zinečnatý
