

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Sulfan produkující enzymy u kančích spermií během
kapacitace**

Diplomová práce

**Bc. Zuzana Pilsová
Reprodukční biotechnologie**

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

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Sulfan produkující enzymy u kančích spermií během kapacitace" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. 4. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph. D. za odborné vedení mé diplomové práce, za ochotu a za veškeré cenné rady. Také bych chtěla poděkovat Ing. Kateřině Havlíkové za pomoc a metodické vedení při práci v laboratoři a Ing. Lence Hackerové za rady a konzultace mé diplomové práce. Nakonec bych chtěla poděkovat i své sestře Bc. Anetě Pilsové, se kterou jsem na experimentech spolupracovala a s níž jsem sdílela veškeré úspěchy a neúspěchy v laboratoři i při psaní diplomové práce. Na závěr bych chtěla poděkovat i mé rodině za podporu a trpělivost jak při práci na diplomové práci, tak po celou dobu mého studia.

Sulfan produkující enzymy u kančích spermii během kapacity

Souhrn

Diplomová práce byla zacílena na problematiku sulfanu (H_2S) jakožto plynné signální molekuly v savčím organismu. Intracelulárně je sulfan syntetizován enzymy cystathionin- β -syntázou (CBS), cystathionin- γ -lyázou (CSE) a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázou (3-MST). H_2S zajišťuje celou řadu fyziologických procesů v různých orgánových soustavách a postupně se také odkrývá jeho funkce v reprodukčním traktu, nicméně o jeho expresi ve spermii se zatím stále mnoho neví. Na základě již dříve provedených experimentů na Katedře veterinárních disciplín na České zemědělské univerzitě v Praze byla prokázána přítomnost výše uvedených sulfan produkujících enzymů v kančích spermii. Jelikož během kapacity spermii dochází k degradaci některých povrchových proteinů spermie, cílem práce bylo ověřit hypotézu, že exprese sulfan produkujících enzymů se během kapacity kančích spermii mění. Kančí spermie byly získávány z komerčně dostupných inseminačních dávek. Pomocí specifických protilátek byla sledována exprese jednotlivých sulfan produkujících enzymů (CBS, CSE, 3-MST) během kapacity. K detekci enzymů byla využita metoda Western blot a imunofluorescence s využitím fluorescenční a konfokální mikroskopie. Změna exprese enzymů během kapacity byla prokázána u CBS a CSE. Zatímco exprese CBS se s prodlužující se dobou kapacity snižovala, u CSE došlo ke snížení. Změna exprese 3-MST v průběhu kapacity však prokázána nebyla.

Klíčová slova: spermie, sulfan, kapacity, reprodukce

Sulphan-producing enzymes in boar sperm during capacitation

Summary

This thesis was targeted at the issue of hydrogen sulfide (H₂S) as a gaseous signal molecule in the mammalian organism. H₂S is intracellularly synthesized by cystathionine-β-synthase (CBS), cystathionine-γ-lyase (CSE) and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST). H₂S is part of many physiological processes in various organ systems and gradually is being discovered its functions in the reproductive tract, however little is known about its expression in sperm. Based on previously made experiments at Katedra veterinárních disciplín of Czech university of life sciences in Prague, the presence of sulphan-producing enzymes was proved in boar sperm. As some sperm surface proteins are degraded during sperm capacitation, the aim of this work was to verify the hypothesis that the expression of these sulphan-producing enzymes is changing during the capacitation of boar sperm. Boar sperm for experiments were obtained from commercially available insemination doses. Using specific antibodies was monitored the expression of each sulphan-producing enzyme (CBS, CSE, 3-MST) during capacitation. A Western blot and immunocytochemistry method together with fluorescence and confocal microscopy was used to detect enzymes. The change in enzyme expression during capacitation was confirmed in CBS and CSE. While CBS expression decreased during capacitation, in CSE it was increasing. However, the change in expression during capacitation was not confirmed in 3-MST.

Keywords: sperm, hydrogen sulfide, capacitation, reproduction

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3	Přehled literatury	10
3.1	Vznik a zrání spermie.....	10
3.1.1	Spermatocytogeneze	10
3.1.2	Spermatohistogeneze	11
3.1.3	Morfologie spermie.....	12
3.1.4	Epididymální maturace	18
3.1.5	Kapacitace.....	19
3.1.6	Akrozomová reakce	22
3.2	Sulfan	23
3.2.1	Vlastnosti sulfanu	24
3.2.2	Produkce a metabolismus	24
3.3	Sulfan produkující enzymy	26
3.3.1	CBS.....	26
3.3.2	CSE.....	27
3.3.3	3-MST.....	27
3.4	Funkce sulfanu v organismu	27
3.5	Funkce sulfanu v reprodukci.....	32
4	Metodika	35
4.1	Použité chemikálie a média.....	35
4.2	Příprava vzorků	36
4.3	Imunofluorescenční stanovení sulfan produkujících enzymů.....	37
4.4	Stanovení sulfan produkujících enzymů metodou Western blot.....	38
4.5	Statistická analýza.....	39
5	Výsledky	40
6	Diskuse.....	49
7	Závěr	51
8	Literatura.....	52

1 Úvod

Oxid dusnatý (NO) a oxid uhelnatý (CO) jsou plynné signální molekuly, které v organismu zajišťují buněčnou signalizaci. Mezi tyto signální molekuly, též nazývané jako gasotransmitery, byl již v 90. letech minulého století zařazen také sulfan (H_2S), který byl do té doby považován za toxickou látku. Následovalo mnoho studií zabývajících se sulfanem, jež objasnily metabolismus a produkci sulfanu v organismu. Sulfan je v savcích tkáních produkován enzymy cystathionin- β -syntázou (CBS), cystathionin- γ -lyázou (CSE) a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázou (3-MST) (Łowicka & Bełtowski 2007).

Produkce H_2S byla popsána v celé řadě tkání savců, v nichž má sulfan svoji specifickou funkci, a kde jeho nedostatek či naopak nadbytek může ovlivnit patogenezí některých onemocnění. Sulfan byl popsán například v nervovém systému, ve kterém je jednou z jeho hlavních funkcí ochrana neuronů před oxidačním stresem. Nedostatečná koncentrace H_2S byla pozorována například u pacientů z Alzheimerovou či Huntingtonovou chorobou, což poukazuje na možné terapeutické využití sulfanu (Eto et al. 2002; Whiteman et al. 2004). Další orgánovou soustavou, kde H_2S působí, je kardiovaskulární systém, ve kterém sulfan snižuje krevní tlak, podporuje angiogenezi, zabraňuje vzniku aterosklerózy a chrání srdce před infarktem. Svou roli hraje H_2S i v gastrointestinálním traktu, vyskytuje se též v ledvinách, játrech či buňkách pankreatu (Łowicka & Bełtowski 2007). V neposlední řadě je třeba zmínit i jeho expresi v plicích, sulfan je totiž nyní diskutován jako možný terapeutický prostředek při léčbě onemocnění Covid-19 (Yang 2020).

Nedávné studie potvrdily přítomnost sulfanu také v reprodukčním traktu, i zde je sulfan součástí mnoha fyziologických procesů. Nejzajímavějším zjištěním je bezpochyby fakt, že H_2S napomáhá erekci penisu, vyskytuje se však i u samic, a to v děloze, placentě, ale i v samotných oocytech (Srilatha et al. 2006; Srilatha et al. 2009; Krejčová et al. 2015). Wang et al. (2018) ve své studii popsal přítomnost sulfanu také v lidských spermích a díky dřívějším experimentům provedených na Katedře veterinárních disciplín na České zemědělské univerzitě v Praze byly sulfan produkující enzymy potvrzeny i u kančích spermii. Proto byla tato práce zacílena na zjištění, zda se koncentrace těchto enzymů mění během kapacity kančích spermii.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Na základě dřívějších výsledků, jenž prokázaly, že se sulfan produkující enzymy vyskytují v kančích spermích, byla stanovena hypotéza, že exprese těchto enzymů se v průběhu kapacitace kančích spermií mění. Cílem práce tedy bylo shrnout současné poznatky o sulfanu a sulfan produkujících enzymech se zaměřením na reprodukční systém a ověření stanovené hypotézy. Pro ověření hypotézy byla k detekci enzymů produkujících sulfan využita metoda imunofluorescence a Western blot.

3 Přehled literatury

3.1 Vznik a zrání spermie

Spermie jsou samčí pohlavní buňky vznikající v semenotvorných kanálcích varlete procesem zvaným spermatogeneze, jenž v sobě zahrnuje dvě vývojové etapy. První etapou je spermatocytogeneze, během které vznikají množením a diferenciací ze spermatogonií haploidní spermatidy. Následuje spermatohistogeneze, kdy dochází k přestavbě spermatidy ve zralou spermii s bičíkem. Tato spermie je transportována do nadvarlete, kde dochází k epididymální maturaci. Výsledkem je zralá pohyblivá spermie, která může podstoupit kapacitaci a následně akrozomovou reakci v samičím reprodukčním traktu. Takováto spermie je poté schopna oplození.

3.1.1 Spermatocytogeneze

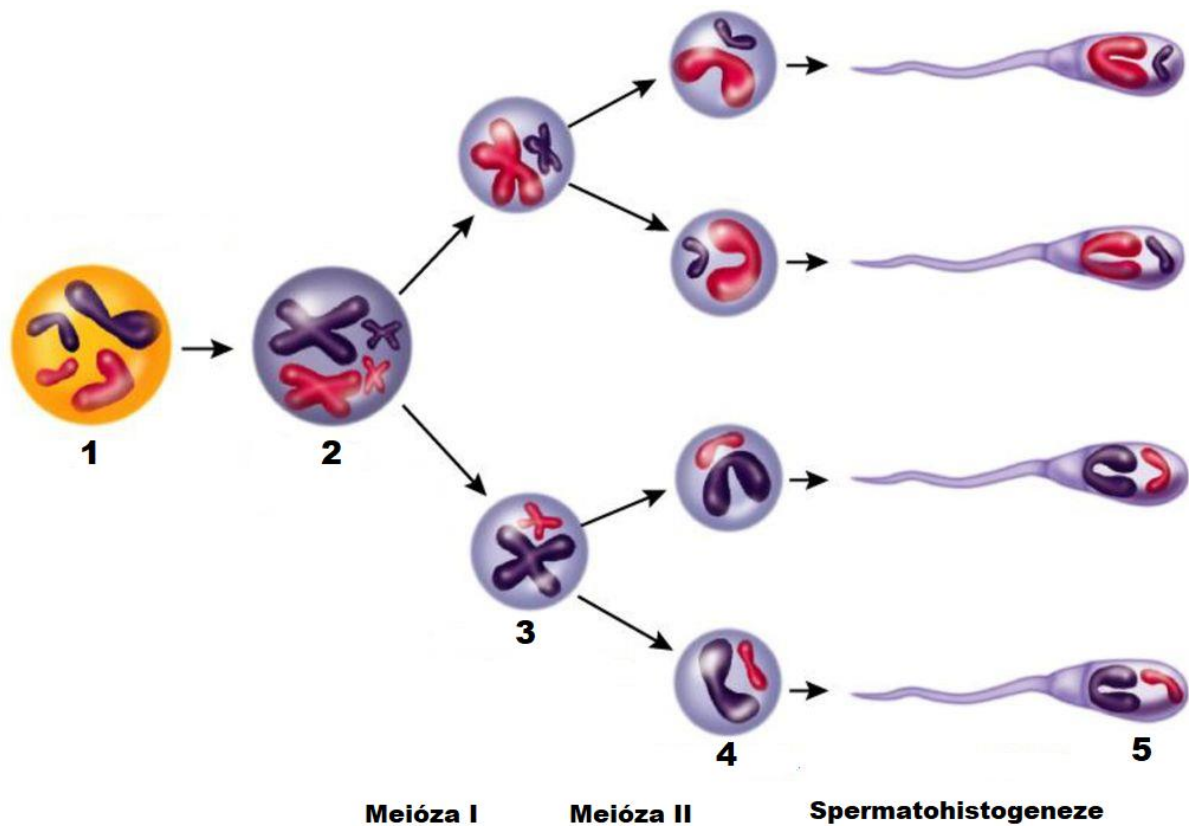
Spermatocytogeneze se odehrává ve stočených semenotvorných kanálcích varlete a probíhá po celou dobu pohlavní aktivity samce ve formě tzv. spermatogenetických vln. Celý proces lze rozdělit na tři periody – periodu množení, růstu a zrání (viz Obr. č. 1).

Perioda množení je charakteristická ekvačním mitotickým dělením kmenových buněk (spermatogonií A). Tato buňka se rozdělí na dvě nestejně velké dceřiné buňky. Ta větší a více podobná mateřské buňce zůstává v latentním stádiu, ta druhá se opětovně několikrát dělí a výsledkem jsou spermatogonie typu B. Fáze množení končí rozdělením spermatogonie typu B, čímž vznikne primární spermatocyt, jenž vstupuje do další fáze (Russell et al. 1993).

Perioda růstu je typická tím, že spermatocyt 1. řádu zvětšuje svůj objem. Jde o poměrně dlouhé období, které zahrnuje meiotickou profázi 1. Tato profáze je značně delší než profáze u běžné mitózy, DNA se jednou replikuje a chromozomy se pouze jednou rozštěpí (Meistrich & van Beek 1993).

Následuje perioda zrání, která je charakteristická dvěma po sobě jdoucími zracími děleními. Při prvním zracím dělení dojde k dokončení prvního redukčního dělení, kdy ze spermatocyty 1. řádu vzniknou dva spermatocyty 2. řádu. Sekundární spermatocyt má již v jádře pouze haploidní počet chromozomů. Ve spermatocytech 2. řádu nedochází k rekonstrukci jádra, následuje interkineze a druhé zrací dělení (Kittnar 2011). Toto dělení má charakter běžné mitózy a probíhá podstatně rychleji než první dělení. Každý sekundární spermatocyt se dělí na dvě spermatidy, které mají taktéž haploidní počet chromozomů, navzájem se však od sebe liší typem heterochromozomu. Jedna spermatida obsahuje heterochromozom X a druhá Y (Russell et al. 1993; Phillips et al. 2010).

Během spermatocytogeneze dochází k posunu jednotlivých stádií k lumen semenotvorných kanálků, takže vzhledem k časovému rozdílu začátku jednotlivých period se v semenotvorném kanálku nachází celkem čtyři buněčné generace nad sebou (de Rooij 2017).

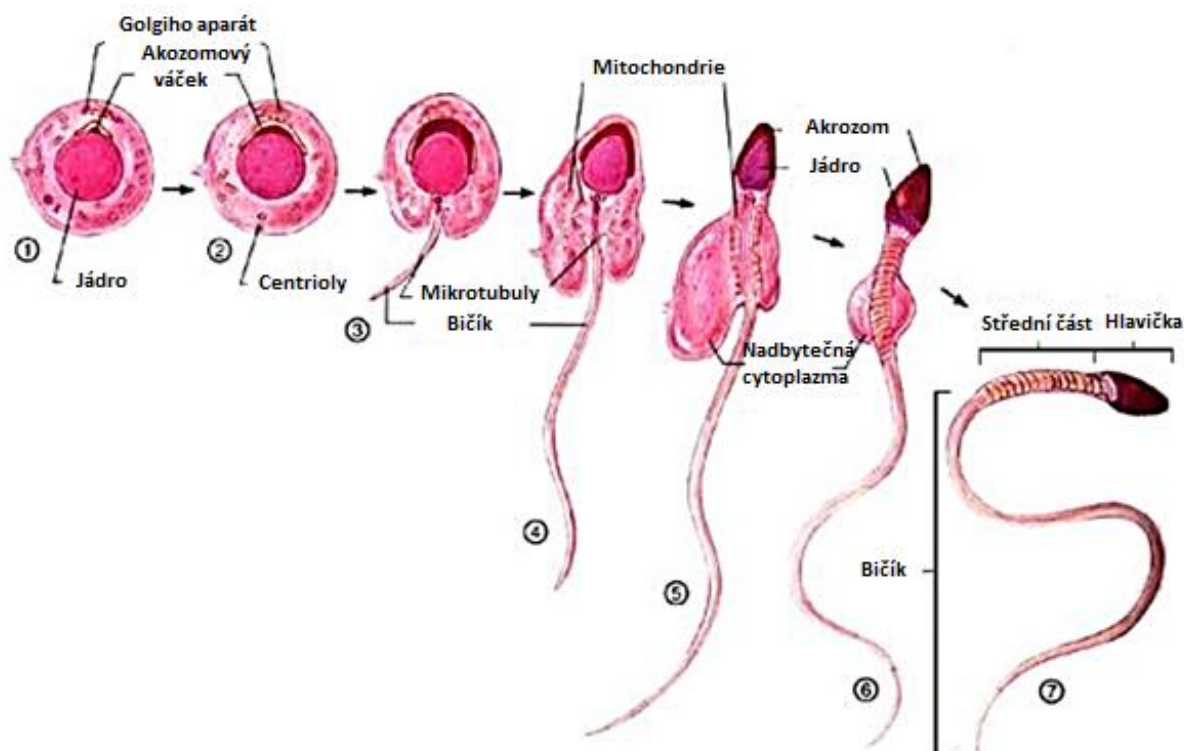


Obrázek č. 1 - Jednotlivé kroky spermatogeneze. 1 - spermatogonie, 2 - spermatocyt prvního řádu, 3 - spermatocyt druhého řádu, 4 - spermatida, 5 - spermie (Foster 2018).

3.1.2 Spermatohistogeneze

Spermatohistogeneze je proces, při kterém se spermatidy přeměňují na zralé pohlavní buňky opatřené bičíkem (viz Obr. č. 2). Tento děj se odehrává ve výběžcích Sertoliho buněk a lze jej rozdělit na čtyři stádia – Golgiho stádium, stádium akrozomové čepičky, stádium kaudální manžety a stádium zrání. Během těchto stádií dochází k výrazným cytologickým změnám. Celá buňka se protahuje, jádro se posouvá k apikálnímu pólu buňky a tvoří tak hlavičku spermie. V Golgiho aparátu se začínají hromadit proakrozomová granula, která následně splývají a vytváří akrozomový váček, jenž se přesouvá k přední části hlavičky spermie a přetáhne se přes ni jako čepička. Kolem distálního pólu jádra se seskupují mikrotubuly vytvářející kaudální manžetu. Centrioly se přesouvají k zadnímu pólu hlavičky a dávají vznik krčku a osovému vláknu bičíku spermie. Přebytečná cytoplazma je vyloučena a fagocytována Sertoliho buňkami (Bettegowda & Wilkinson 2010).

Takto metamorfované spermie se uvolňují z výběžků Sertoliho buněk a postupují z lumen semenotvorných kanálků do vývodných cest varlete. Poté jsou transportovány do nadvarlete, ve kterém dochází k epididymální maturaci, která je nutná pro proces oplození (Meistrich & van Beek 1993).

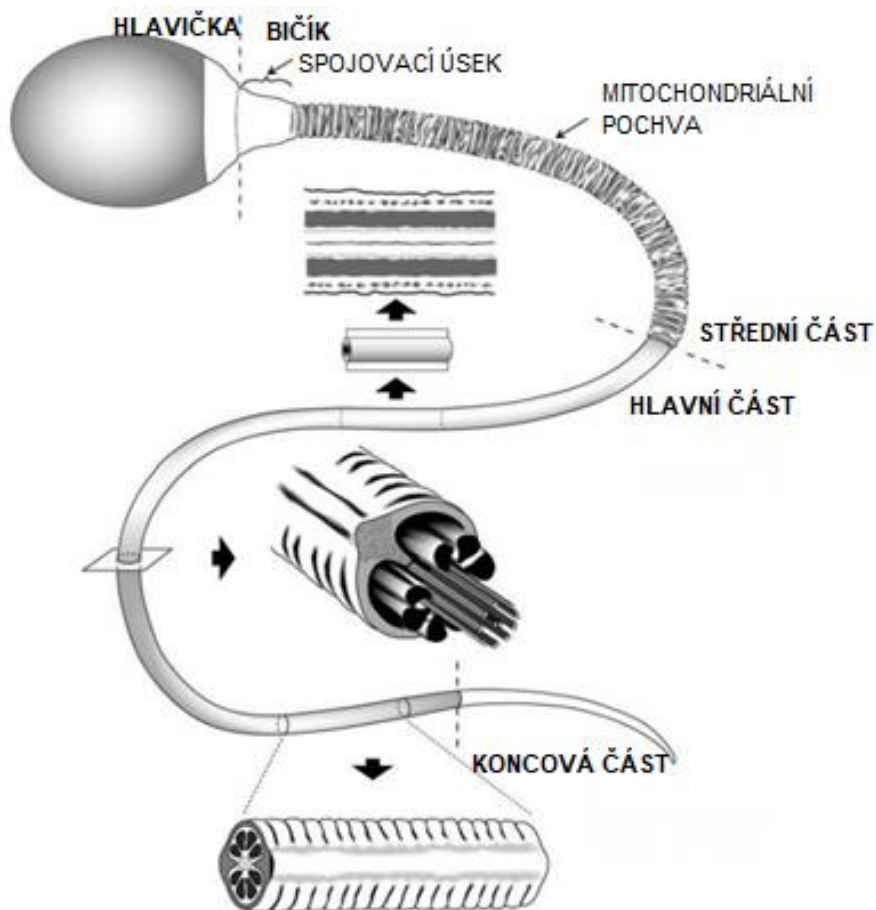


Obrázek č. 2 - Jednotlivé kroky spermatohistogeneze (1-7). Proces přeměny kulaté spermatidy na spermii s bičíkem. (Cummings 2004)

3.1.3 Morfologie spermie

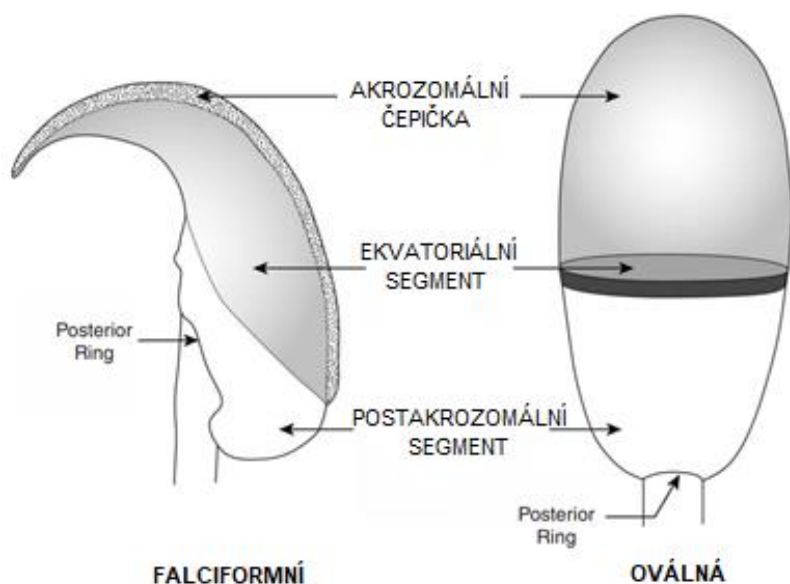
Eddy a O'Brien (1994) rozlišují z hlediska morfologie dvě hlavní části spermie – hlavičku a bičík, které jsou navzájem propojeny spojovacím oddílem (viz Obr. č. 3). Součástí hlavičky je jádro, akrozom, cytoskeletární struktury a malé množství cytoplazmy. Bičík je rozdělen celkem na tři části – střední, hlavní a koncovou.

Velikost hlavičky se pohybuje v rozmezí 5–10 μm . Její tvar se u různých savčích druhů velmi liší, což souvisí s uspořádáním jádra, akrozomu a cytoskeletárních částic. Morfologicky lze rozlišit dva základní tvary hlaviček – falciformní a oválné (viz Obr. č. 4). Většina savčích spermíí má oválný tvar hlavičky se symetrickým jádrem a akrozomem zploštěným v předozadní ose spermie. Naproti tomu falciformní, nebo také háčkovitý typ hlavičky lze pozorovat u myši a některých dalších hlodavců. U takovýchto spermíí akrozom překrývá konvexní okraj jádra (Eddy & O'Brien 1994).



Obrázek č. 3 - Morfologické části spermie. Hlavička spermie je k bičíku připojena spojovacím oddílem. Bičík je rozdělen na tři části – střední, hlavní a koncovou. Střední část obsahuje mitochondriální pochvu, zatímco součástí hlavní části je vláknitá pochva. Podélné a příčné řezy hlavní části jsou označeny šipkami (Eddy & O'Brien 1994).

Jádro zaujímá velkou část prostoru v hlavičce spermie a obsahuje vysoce kondenzovaný chromatin, jehož objem je podstatně menší než u klasické somatické buňky. Nejvíce zastoupenými proteiny v jádře jsou protaminy, relativně malé aminokyseliny bohaté na arginin a cystein (Hecht 1999). Tyto bílkoviny jsou důležité pro stabilizaci chromatinu uvnitř jádra, protože obsahují disulfidické můstky mezi protaminy na sousedních řetězcích DNA (Cosman et al., 1999). Další proteiny zastoupené v jádře jsou histony, které se podílejí na uspořádání DNA, protože jsou nezbytné pro vytvoření nukleozomů (Tanphaichitr et al. 1978). Uvnitř jádra se dále nachází jadérko a jaderná lamina, což je síť intermediálních filament tvořící kostru jádra (karyoskeleton) (Krohne & Benavente 1986). Celé jádro je obaleno vnitřní a vnější jadernou membránou, ve které jsou póry tvořené nukleoporiny. Tyto póry slouží ke komunikaci mezi cytoplazmou a jádrem (Eddy & O'Brien 1994).



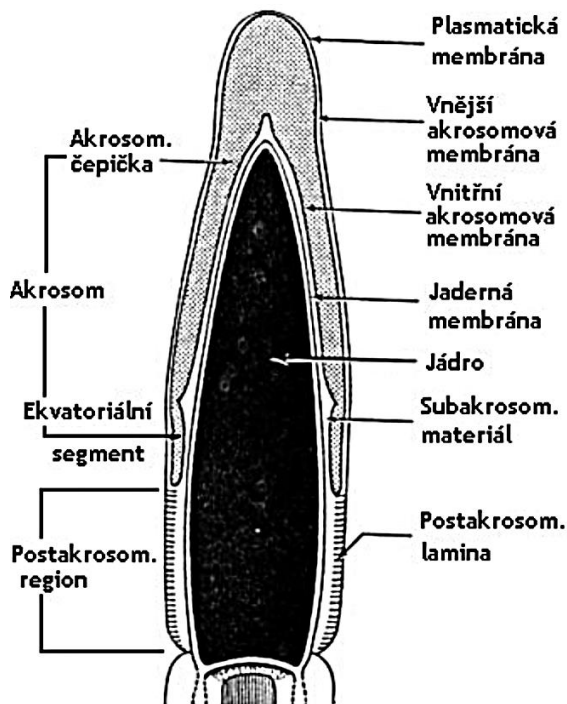
Obrázek č. 4 - Morfologické tvary hlaviček spermii a jejich hlavní části. Hlavička spermie se rozděluje na akrozomální a postakrozomální segment. Akrozomální oblast hlavičky falciiformní spermie má ve srovnání s oválnou spermii relativně malou akrozomovou čepičku, ekvatoriální segment je však značně větší. Postakrozomální oblast je ta část hlavičky spermie, která není pokryta akrozomem. Posterior ring definuje hranici mezi postakrozomálním segmentem a spojovacím oddílem (Eddy & O'Brien 1994).

Cytoskelet hlavičky spermie se nachází ve třech oblastech. Popisuje se subakrozomový (Yanagimachi & Noda 1970), postakrozomový a para-akrozomový segment, jenž je typický pro falciiformní tvar hlavičky (Olson & Winfrey 1985). Pro cytoskelet hlavičky spermie jsou charakteristické proteiny tubulin, aktin a spektrin (Kann et al. 1991; de Lourdes Juárez-Mosqueda & Mújica 1999). Hlavní funkcí těchto cytoskeletárních struktur je udržování tvaru hlavičky (Yanagimachi & Noda 1970) a pomoc při průniku do vajíčka při oplození (Czaker 1985).

Akrozom je buněčná organela typická pouze pro spermii, která obsahuje enzymy nezbytné pro průnik spermie do vajíčka a vzniká v průběhu spermatogeneze z Golgiho aparátu. Když se samčí pohlavní buňka nachází ve fázi rané spermatidy, Golgiho komplex, který se sestává ze zploštělých cisteren a vezikulů různých velikostí, značně promínuje. První výraznou pozorovatelnou morfoloickou změnou je hypertrofie Golgiho aparátu následovaná zvýšením počtu a velikosti oddělujících se vezikulů. V této fázi vývoje spermatidy obklopují jádro mikrovezikuly a několik mitochondrií. Malé vezikuly splývají, což vede ke vzniku makrovezikulu, který je též známý jako proakrozomální váček a který se připojuje k jaderné membráně spermatidy. Po této fázi následuje postupné zplošťování proakrozomálního váčku, čímž se vytvoří akrozomový váček. Také dochází k prodlužování spermatidy a samotného jádra, proto se i akrozomový váček rozšiřuje tak, aby pokryl přední část jádra spermatidy. Tímto je vývoj akrozomu dokončen (Olukole et al. 2018).

Akrozom je membránou uzavřený váček, který obklopuje jádro v přední části hlavičky. Vnější jadernou membránu překrývá vnitřní akrozomová membrána, na kterou navazuje vnější akrozomální membrána ležící blízko vnitřního povrchu plazmatické membrány (viz Obr. č. 5).

Eddy a O'Brien (1994) rozdělují akrozom na dva segmenty – akrozomální čepičku a ekvatoriální segment. Součástí akrozomální čepičky jsou molekuly, jež jsou potřeba pro primární vazbu na *zona pellucida*. Během akrozomové reakce vnější akrozomová membrána a plazmatická membrána fúzí a tím je většina obsahu akrozomu uvolněna. Vnitřní akrozomová membrána a ekvatoriální část u většiny druhů přetrvávají až do fúze spermie s vajíčkem, obsahují totiž molekuly nutné pro sekundární vazbu spermie na *zona pellucida* (Fawcett 1970). Konečný tvar akrozomu může být ovlivněn cytoskeletárními prvky obsaženými v cytoplazmě spermatid či Sertoliho buněk (Olson & Winfrey 1985) nebo jádrem (Furukawa & Hotta 1993). U některých druhů však může probíhat diferenciací akrozomu i mnohem později, například až v distální části nadvarlete (Russell 1984). Končený tvar je také samozřejmě ovlivněn genetickými faktory.



Obrázek č. 5 - Jednotlivé části akrozomu. Akrozom se skládá z oblasti akrozomové čepičky a ekvatoriálního segmentu. Jeho součástí jsou dvě membrány – vnitřní a vnější akrozomová membrána, mezi nimiž se nachází akrozomová matrix, jež obsahuje hydrolytické enzymy (Eddy & O'Brien 1994).

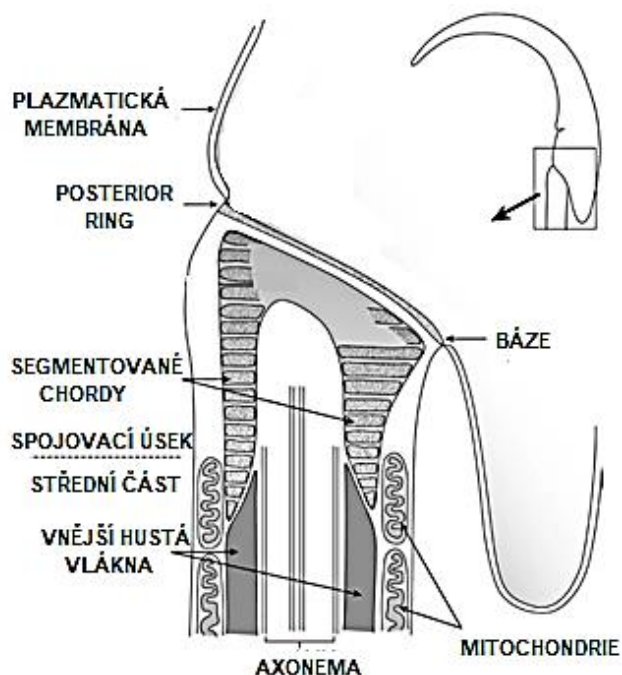
V matrix akrozomu je přítomno mnoho enzymů (viz Tab. 1). Nachází se zde kyselé hydrolázy, které se běžně vyskytují v lysozomech, a další enzymy specifické pro spermatogenní buňky. Nejznámějším enzymem je akrozin, který se v akrozomu nachází v neaktivní formě jako proakrozin, a to hlavně v předním segmentu akrozomu (Garner & Easton 1977), nicméně byl také detekován ve vnitřní akrozomální membráně (Green & Hockaday 1978). Akrozin je zodpovědný za štěpení *zona pellucida*. Mezi další hydrolytické enzymy akrozomu patří například hyaluronidáza (Zaneveld et al. 1973), neuraminidáza (Srivastava & Abou-Issa 1977), kyselá fosfatáza (Gonzales & Meizel 1973), kolagenáza (Koren & Milkovic 1973), esteráza (Bryan & Unnithan 1972), fosfolipáza A (Meizel 1984) a C (Ribbes et al. 1987) a mnoho dalších. Během akrozomové reakce se obsah akrozomu vápníkem zprostředkovanou

exocytózou uvolňuje. Po uvolnění a aktivaci akrozomálních enzymů dojde k penetraci *zona pellucida* obklopující oocyt (Beyler & Zaneveld 1982).

Tabulka 1 – Enzymy nacházející se v akrozomu spermie

Enzymy akrozomu	
Enzym	Zdroj
Hyaluronidáza	(Zaneveld et al. 1973)
Neuraminidáza	(Srivastava & Abou-Issa 1977)
β -N-Acetylglukosaminidáza	(Stambaugh & Buckley 1970)
β -D-Galaktosidáza	(Majumder & Turkington 1974)
Arylsulfatáza	(Koren & Milkovic 1973)
Arylamidáza	(Meizel & Cotham 1972)
Proakrosin/Akrosin	(Polakoski & Parrish 1977)
Kathepsin D	(Erickson & Martin 1974)
Kathepsin L	(Haraguchi et al. 2003)
Kalpain	(Schollmeyer 1986)
Kolagenáza	(Koren & Milkovic 1973)
Fosfatáza	(Gonzales & Meizel 1973)
Fosfolipáza A	(Meizel 1984)
Fosfolipáza C	(Ribbes et al. 1987)
Esteráza	(Bryan & Unnithan 1972)

Bičik spermie lze rozdělit na čtyři části – spojovací (krček), střední, hlavní a koncovou. Krček spojuje hlavičku a bičik spermie a je tvořen dvěma za sebou uspořádanými centrioly - proximálním a distálním. Hlavní strukturou bičíku je axonema, mitochondriální pochva, vnější hustá vlákna a vláknitá pochva (viz Obr. č. 6). Axonema se táhne celým bičíkem a skládá se ze dvou centrálních tubulů obklopených devíti mikrotubulárními dublety. K axonemě přiléhají vnější hustá vlákna sahající od spojovací části bičíku po konec hlavní části. Charakteristickým rysem středního segmentu je mitochondriální pochva, která je tvořena spirálovitě seskupenými mitochondriemi. Díky tomuto mitochondriálnímu aparátu je produkována energie ve formě ATP a spermie se tak mohou pohybovat. Vnější hustá vlákna v hlavním segmentu obklopuje vláknitá pochva, která reguluje pohyby bičíku a jejíž součástí jsou enzymy potřebné pro glykolýzu (Oura 1971; Zamboni & Stefanini 1971), mitochondriální pochva se zde nenachází. Koncová část je tvořena pouze centrálním párem mikrotubulů, jenž jsou obalené plazmatickou membránou. Bičik poskytuje pohybovou sílu potřebnou pro dosažení povrchu vajíčka a oplození. Různé prvky bičíku generují a tvarují vlny ohybu, vlny se šíří od hlavního po koncový oddíl (Baccetti 1984).



Obrázek č. 6 - Spojovací úsek spermie. Spojovací úsek slouží k připojení hlavičky a bičíku spermie. Na obrázku jsou patrné také mitochondrie tvořící mitochondriální pochvu kolem středního úseku, vnější hustá vlákna vinoucí se až po konec hlavního úseku a axonema, která se nachází v celé délce bičíku (Woolley & Fawcett 1973).

Na povrchu celé spermie se nachází plazmatická membrána, která je tvořena lipidovou dvojvrstvou. Součástí lipidové dvojvrstvy jsou hlavně fosfolipidy, ale i cholesterol, glykolipidy či sfingolipidy. Tímto uspořádáním je zajištěna nejen samozacelovací funkce, ale také tzv. fluidita membrány, kdy se jednotlivé komponenty v membráně přeskupují. Fluidita membrány je tím vyšší, čím je vyšší teplota, kratší řetězec mastných kyselin, vyšší počet nenasycených řetězců mastných kyselin nebo naopak menší množství cholesterolu v membráně. Další komponentou jsou membránové proteiny či glykoproteiny, které fungují jako přenašeče, receptory, spojníky či jako enzymy. Proteiny mohou být na membránu připojeny buď periferně, nebo mohou být transmembránové (Eddy & O'Brien 1994).

Plazmatická membrána spermie se dělí do regionálních domén lišících se složením a funkcí (Koehler 1978). Hlavními zónami plazmatické membrány na hlavičce spermie jsou akrozomální a postakrozomální oblast. Plazmatickou membránu akrozomální oblasti lze rozdělit na doménu apikální, hlavní a ekvatoriální segmentu (Bearer & Friend 1990). Postakrozomální oblast zahrnuje plazmatickou membránu mezi zadní částí akrozomu a spojovacím úsekem. Plazmatická membrána bičíku se rozděluje na doménu středního, hlavního a koncového segmentu (Eddy & O'Brien 1994). Většina domén na povrchu spermie je pravděpodobně vytvořena během spermatogeneze, spermie však během zrání v nadvarletí prochází dalšími povrchovými změnami, a tak některé domény získávají svoji konečnou podobu až po průchodu nadvarletem. Během různých fází fertilizace jsou komponenty plazmatické membrány jednotlivých domén ztraceny, měněny, přeskupovány či nahrazovány (Hunnicut et al. 1997).

3.1.4 Epididymální maturace

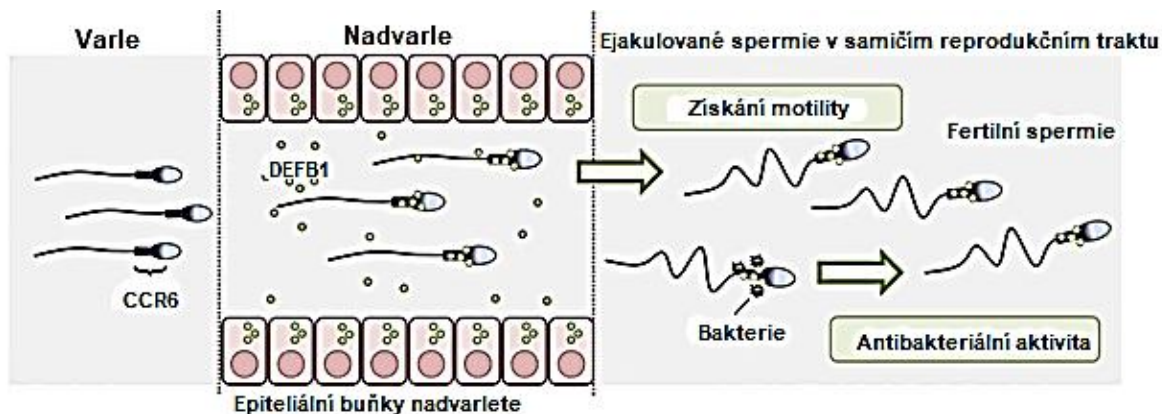
Po proběhlé spermatogenezi ve varlatech obsahují spermie všechny orgány, které potřebují, nicméně stále nejsou schopné se pohybovat a oplodnit vajíčko. Aby spermie získaly schopnost oplození, je třeba, aby proběhla epididymální maturace. Nadvarle (epididymis) lze rozdělit do třech anatomických segmentů – hlava (caput), tělo (corpus) a ocas (cauda), na který navazuje chámovod. Každá tato část vykazuje rozdílnou expresi genů a udržuje odlišné koncentrace iontů, které jsou nezbytné pro zrání spermií (Gervasi & Visconti 2017).

Během zrání spermie v nadvarletí dochází ke změnám ve složení proteinů, lipidů i sacharidů na plazmatické membráně. Membránové proteiny a glykoproteiny pocházející z varlat (testes) mění svoje rozmístění, některé proteiny jsou navíc upravovány, maskovány či nahrazeny novými proteiny pocházejícími z epididymu (Teclé & Gagneux 2015). Membránové lipidy spermie mění své fyzikální a chemické vlastnosti a roste záporný náboj na povrchu spermie. Dochází také ke změnám fluidity membrány, a to díky cholesterolu, jenž se zabudovává do plazmatické membrány spermie a tím ji stabilizuje (Jones 2002; Saez et al. 2010). Dále se vytváří receptory pro interakci spermií s vajíčkem a zvyšují se lektin vázající schopnosti membrány (Srivastava & Olson 1991).

V nadvarletí se exprimuje značné množství proteinů, některé z nich se mohou vázat na spermie nebo mohou být pouze součástí jejich maturačního prostředí (viz Obr. č. 7). Některé z těchto proteinů se podílejí na vývoji funkcí spermie, jako je například rozvoj motility (Murta et al. 2016), nebo podpora kapacity (Krapf et al. 2012) a akrozomové reakce spermie (Joshi et al. 2013). Dále se účastní vazby spermie na *zona pellucida* a na samotné fúzi gamet (Frenette & Sullivan 2001). Mohou být proteinázovými inhibitory nebo naopak enzymy, mají antibakteriální účinky či vážou cholesterol. Některé proteiny mohou být do spermie zabudovány pomocí epididymosomů, což jsou extracelulární vezikuly tvořené v nadvarletí. Tyto váčky se oddělují od epididymálních buněk a přenášejí proteiny do plazmatické membrány spermie pomocí fúze (Sullivan & Saez 2013; Belleannée 2015; Sharma et al. 2016).

V nadvalertí dále dochází k degradaci poškozených či starých spermií prostřednictvím aktivity ubiquitin-proteasomového systému, který pomocí specifických enzymů degraduje potřebné proteiny. Tento systém se využívá také pro „opracování“ proteinů na povrchu spermie, některé proteiny totiž spermie při průchodu nadvarletem ztrácí (Sutovsky et al. 2001).

V neposlední řadě bylo prokázáno, že epididymální maturace je spojena i s posttranslačními změnami proteinů, včetně fosforylace a oxidace thiolových skupin. Předpokládá se, že během zrání spermií se oxidací proteinových thiolových skupin a tvorbou disulfidických můstků postupně stabilizuje struktura např. jádra nebo bičíku spermií. Tato stabilizace proteinů má pravděpodobně důležitou funkci související s následným získáním motility (Bedford & Calvin 1974a; Bedford & Calvin 1974b).



Obrázek č. 7 - Epididymální maturace. Při průchodu nadvarletem dochází epiteliálními buňkami nadvarlete k sekreci různých proteinů, které působí jako maturační prostředí pro spermie či se na spermie přímo vážou (Diao et al. 2014).

3.1.5 Kapacitace

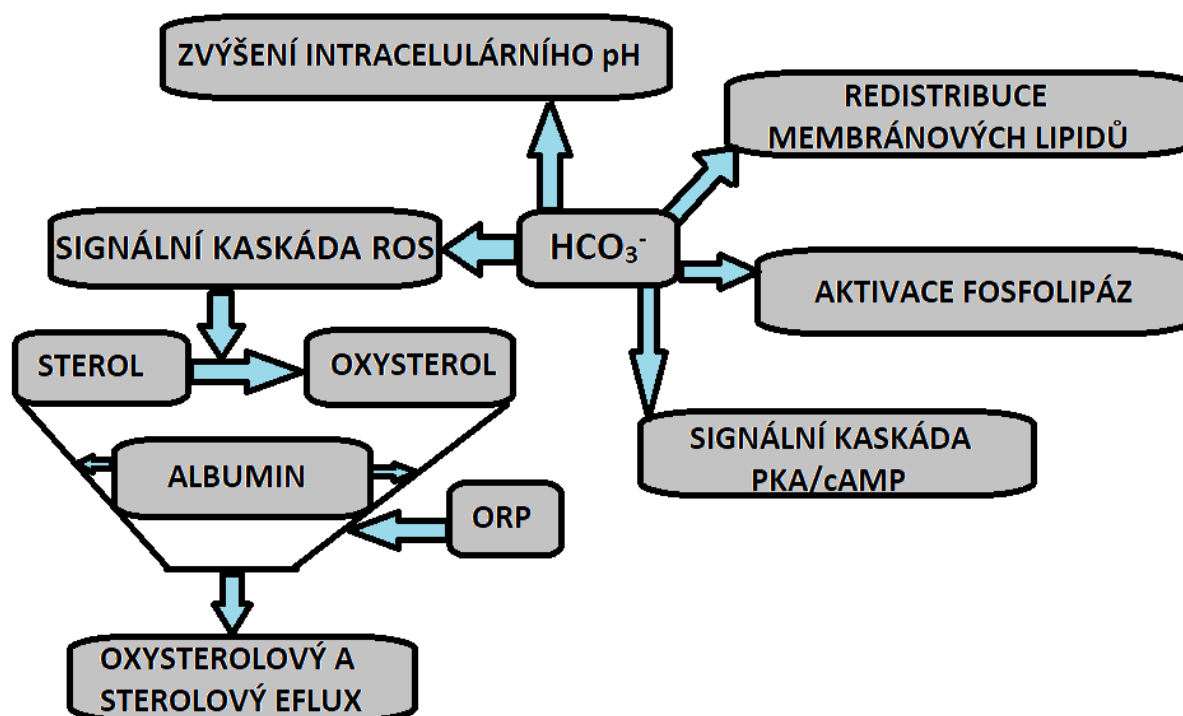
Po průchodu spermie nadvarletem dochází k ejakulaci, při které se spermie dostanou do prostředí semenné plazmy vyprodukované přídatnými pohlavními žlázami. Tato frakce obsahuje různé elementy, které zajišťují výživu spermie a její ochranu, upravují prostředí v samičím pohlavním traktu a také jsou přirozeným ředidlem (Garcia et al. 2006; Caballero et al. 2008). Kromě nejrůznějších iontů či sacharidů obsahují i velké množství proteinů, které se stejně jako v epididymální tekutině zabudovávají do plazmatické membrány a do jisté míry mění její charakter. Tyto proteiny tvoří ochranný obal kolem spermie a chrání receptory nezbytné pro vazbu na *zona pellucida*, jde o tzv. dekapacitační faktory. Plazmatická membrána se dále díky integraci lipoproteinů více stabilizuje (Greube et al. 2004; Ekhlesi-Hundrieser et al. 2005). Dále dochází ke zvýšení schopnosti vázat lektiny, což umožňuje spermii tvorbu oviduktálního rezervoáru. Některé proteiny semenné plazmy hrají roli při primární vazbě na *zona pellucida* (Calvete et al. 1997). Všechny komponenty semenné plazmy jsou důležité pro to, aby správně proběhla kapacitace, akrozomální reakce a spermie úspěšně penetrovala do vajíčka (Töpfer-Petersen et al. 2005).

Kapacitace je proces, při kterém spermie projde řadou fyziologických a biochemických změn, díky kterým je umožněna akrozomová reakce. Kapacitace je zahájena ve chvíli, kdy spermie v určitém časovém úseku pomocí chemotaxe a termotaxe doputuje přes samičí reprodukční trakt až do vejcovodu, konkrétně do jeho isthmu, kde se tvoří tzv. oviduktální rezervoár. Jeho vytvoření je umožněno protein-sacharidovou vazbou mezi plazmatickou membránou spermie a epitelem oviduktálních buněk. Tvorba oviduktálního rezervoáru je nezbytná. Díky tomuto mechanismu je zajištěna synchronizace doby maturace spermií s ovulací oocyty i s následnou dobou oplození. Kromě toho jsou zde selektovány nejschopnější spermie a prodlužuje se i jejich fertilizační schopnost. Navíc jde o místo určené ke kapacitaci spermií, bez které by nemohla proběhnout akrozomová reakce (Gangwar & Atreja 2015).

Počáteční fáze kapacitace je pomalá, začíná odstraněním cholesterolu z plazmatické membrány spermie, což zvyšuje fluiditu membrány a snižuje poměr cholesterolu vůči

fosfolipidům. Cholesterol je z membrány spermie odstraněn vazbou na hydrofobní oblast albuminu (Boerke et al. 2013).

I bikarbonát působící jako pufr má v průběhu kapacitace svoji specifickou funkci (viz Obr. č. 8). Bylo prokázáno, že epididymální tekutina má ve srovnání se samičím reprodukčním traktem nižší koncentrace hydrogenuhličitanových iontů (HCO_3^-). Karbonická anhydráza IV ukotvená v plazmatické membráně transformuje oxid uhličitý (CO_2) přítomný v samičím reprodukčním traktu na hydrogenuhličitanový ion (Wandernoth et al. 2010). Galantino-Homer et al. (2004) prokázal, že při inkubaci býčího spermatu s vyššími koncentracemi CO_2 byla indukovaná kapacitace a tyrosinová fosforylace. Bikarbonát také indukuje redistribuci cholesterolu do apikální části spermie a podporuje promíchání fosfolipidů mezi vnější a vnitřní vrstvou plazmatické membrány. Tímto způsobem usnadňuje albuminem zprostředkovanou extrakci cholesterolu (Gadella & van Gestel 2004). Hydrogenuhličitanové ionty dále zvyšují intracelulární pH, což aktivuje rozpustnou adenyl cyclázu a zvyšuje koncentraci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) v cytosolu. To vede k tyrosinové fosforylaci, která umožňuje hyperaktivaci motility (Hess et al. 2005).

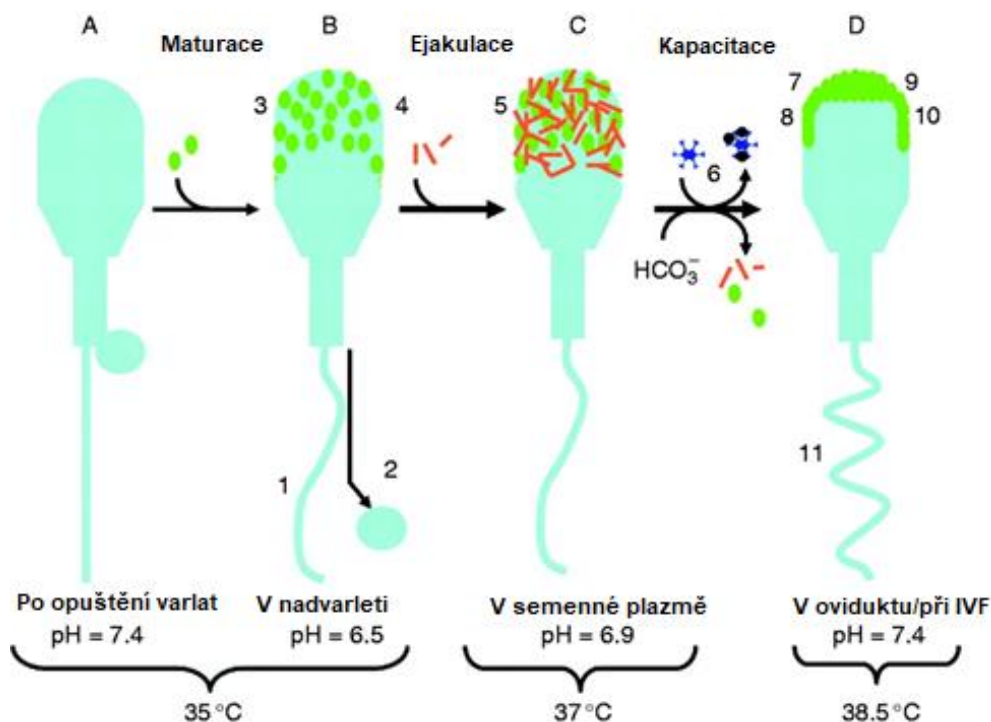


Obrázek č. 8 - Schématické znázornění událostí regulovaných bikarbonátem (HCO_3^-) v průběhu kapacitace spermie. Bikarbonát indukuje tvorbu sterolu a oxysterolu prostřednictvím signální kaskády kyslíkových radikálů (ROS). Působením albuminu a proteinu vázajícího oxysterol (ORP) dochází k efluxu sterolu a oxysterolu. Bikarbonát má také důležitou funkci při remodelaci plazmatické membrány spermie, intracelulární alkalizaci a při aktivaci PKA/cAMP signální kaskády (Gangwar & Atreja 2015).

Další důležitou součástí kapacitace je aktivita vápenatých iontů (Ca^{2+}). V somatické buňce je zdrojem vápníku endoplazmatické retikulum a mitochondrie, nicméně u spermie se vápník ukládá nejspíše v akrozomu a jaderné membráně. Než dojde ke zvýšení hladin Ca^{2+} ,

je třeba zaktivovat kationtové kanály pro vápník, což umožňují kromě glykoproteinů *zona pellucida* (Xia & Ren 2009) také progesteron či prostaglandiny (Lishko et al. 2011). Po zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} dojde ke zvýšení intracelulárního pH, které je spojeno s hyperaktivací motility (Santi et al. 2010). Intracelulární změna pH je nezbytná pro zahájení kapacitace, neboť je třeba, aby došlo k alkalizaci spermie. Na regulaci pH se kromě již zmíněného vápenatého kanálu podílí i sodno-draselné pumpy, HCO_3^- nebo protonové kanály, které vytlačují vodíkové kationty z bičíku (Lishko et al. 2010).

Kyslíkové radikály (ROS) produkované během kapacitace mají také důležitou roli. ROS, jako například peroxid vodíku či oxid dusnatý, stimulují kapacitaci aktivací signální kaskády tyrosinové fosforylace. Superoxid a peroxid vodíku aktivují rozpustnou adenylyl cyklázu, čímž se zvýší intracelulární cAMP a následně se aktivují tyrosinkinázy (O'Flaherty et al. 2006; Roy & Atreja 2008; Jagan Mohanarao & Atreja 2012).



Obrázek č. 9 - Fyziologická sekvence změn na povrchu spermie. A – Morfologicky kompletní spermie opouští varlata bez schopnosti oplodit oocyt. B – V nadvarletí získá spermie schopnost motility (1), ztrácí cytoplazmatickou kapku (2) a podrobuje se závěrečné kondenzaci chromatinu (3). Povrch spermie projde různými molekulárními úpravami, z nichž nejdůležitější je navázání proteinů (zeleně), které se podílejí na vazbě spermie na *zona pellucida* (4), a dekapacitačních faktorů. C – Při ejakulaci se spermie smíchají se semennou plazmou, glykoproteiny (červeně) se navážou na povrch spermie, a tak ji chrání při průchodu samičím pohlavním traktem (5). D – Při dosažení isthmu vejcovodu se při ztrátě dekapacitačních faktorů spustí kapacitace. Za přítomnosti bikarbonátu (HCO_3^-) a albuminu (modře) dojde k řadě změn na povrchu spermie – cholesterol (černě) se oxiduje a pomocí albuminu se odstraňuje z plazmatické membrány (6), epididymální proteiny (zeleně) se přeskupují do apikální části hlavičky spermie (7, 8) a dochází k redistribuci lipidů v plazmatické membráně (9, 10). Zvýšení pH v bičíku spermie způsobí vytlačování vodíkových protonů a tyrosinovou fosforylaci, což vede k hyperaktivaci motility (11) (Leahy & Gadella 2011).

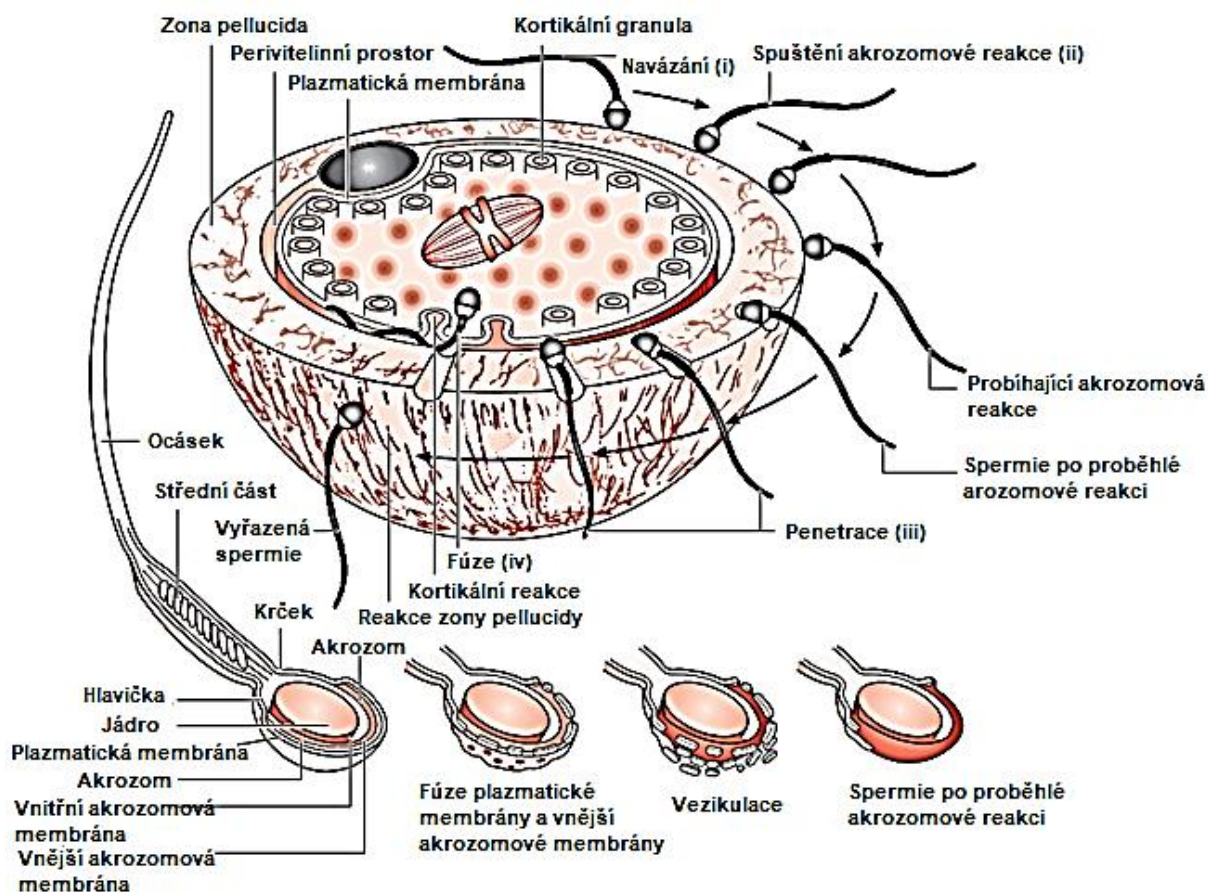
Kromě intracelulárních změn dochází během kapacitace také ke změnám v plazmatické membráně spermie (viz Obr. č. 9). Při tomto procesu se odstraňují proteiny semenné plazmy, jež obsahuje dekapacitační faktory, inhibitor akrozinu, akrozom stabilizující faktory a glykoproteiny (Jones 1989). Ke ztrátě povrchových proteinů dochází díky aktivitě ubikvitin-proteazomového systému (UPS). Aby došlo k degradaci proteinů ubikvitinem, vyžaduje se účast aktivačního enzymu ubikvitinu (E1), ubikvitin konjugujícího enzymu (E2), který zajišťuje transport ubikvitinu k substrátu, a ubikvitin-protein ligázy (E3) zajišťující polyubikvitinylaci. Lineární polyubikvitinové řetězce jsou rozpoznávány proteazomem 26S, jenž protein degraduje na malé peptidy (Glickman & Ciechanover 2002; Sutovsky 2011). Některé studie již prokázaly, že UPS hraje roli v regulaci kapacitace, je totiž zodpovědný za remodelaci plazmatické membrány spermie a akrozomu (Yi et al. 2007; Zimmerman & Sutovsky 2009; Sutovsky 2011). Tato degradace povrchových proteinů vede ke snížení pevnosti vazby v ovidukálním rezervoáru a spolu s hyperaktivací motility má za následek uvolnění spermie z rezervoáru. Tímto způsobem dochází i k odhalení receptorů na spermii, které jsou důležité pro rozpoznání a vazbu na *zona pellucida*.

3.1.6 Akrozomová reakce

Akrozomová reakce je mnohonásobná fúze vnější akrozomové membrány a plazmatické membrány spermie s následným uvolněním obsahu akrozomu. Změny fluidity membrány během kapacitace vedou k fúzogennímu charakteru membrány a tím ke spuštění akrozomové reakce. Fyziologickým induktorem akrozomové reakce je kontakt s glykoproteiny *zona pellucida*, nicméně bylo prokázáno, že dalším induktorem může být například i zvýšená hladina progesteronu (Florman et al. 2008), folikulární tekutina či některé produkty kumulárních buněk, jako jsou prostaglandiny, glykosaminglykany a neoglykoproteiny (Evans et al. 2001).

Při kontaktu spermie se *zona pellucida* dochází k primární vazbě, tedy navázání zonových receptorů spermie na glykoprotein ZP3 *zona pellucida*, což aktivuje G-proteiny v plazmatické membráně spermie a tím se zvyšuje intracelulární pH a Ca^{2+} (Evans et al. 2001; Sutton et al. 2004). Aktivovaný G-protein také stimuluje fosfolipázu A_2 , která začne štěpit fosfatidylcholin na lysofosfatidylcholin a kyselinu arachidonovou, což jsou vysoce fúzogenní látky. Zvýšení koncentrace vápenatých kationtů, vzrůst intracelulárního pH a produkce fúzogenních látek je základním předpokladem pro spuštění akrozomové reakce (Roderick et al. 2003). Následuje splynutí vnější akrozomové membrány a plazmatické membrány spermie a vylití hydrolytických enzymů akrozomu.

Primární funkcí akrozomové reakce je průnik přes *zona pellucida* pomocí enzymatického štěpení glykoproteinů *zona pellucida*, nicméně při fúzi vnější akrozomové membrány a plazmatické membrány spermie dojde k vystavení receptorů na spermii, které jsou zodpovědné za sekundární vazbu na *zona pellucida*, jež je nezbytná pro průnik spermie k plazmatické membráně vajíčka (oolemma). Zároveň jsou vystaveny domény na spermii, které slouží k vazbě na oolemmu a pomáhají při fúzi gamet (viz Obr. č. 10). V neposlední řadě slouží akrozomová reakce jako selekční proces životaschopných a oplození schopných spermií s neporušeným akrozomem (Evans et al. 2001).



Obrázek č. 10 - Postupné události vedoucí k oplodnění. Nejprve dojde k navázání spermie na *zona pellucida*, následuje akrozomová reakce a penetrace přes *zona pellucida* k plazmatické membráně oocytu. Následuje samotná fúze gamet (i – iv) (Wassarman et al. 2001).

3.2 Sulfan

Sulfan neboli hydrogen sulfid (H_2S) je společně s oxidem dusnatým (NO) a oxidem uhelnatým (CO) řazen do skupiny plyných signálních molekul známých pod pojmem gasotransmitery. Mnoho dalších plynů, jako je například kyslík (O_2) a oxid uhličitý (CO_2) hraje v organismu stejnou, ne-li důležitější roli než výše zmíněné gasotransmitery. Tyto plyny si však vysloužily pozornost tím, jakou kontrolu mají nad různými funkcemi některých buněk skrze řadu intracelulárních signálních kaskád. V rámci těchto gasotransmiterů je nejčerstvějším objevem právě H_2S . V akademickém světě to vyvolalo značné pozdvižení, protože sulfan byl do té doby znám pouze jako buňkám toxická molekula. I přesto však bylo prokázáno, že je sulfan v organismu fyziologicky tvořen a ovlivňuje celou řadu fyziologických procesů v těle, aniž by způsobil buněčnou smrt (Li et al. 2011; Kimura et al. 2012). Již nyní se ví, že má sulfan důležitou roli v patogenezi některých onemocnění, jako je například *diabetes mellitus*, různá neurodegenerativní onemocnění či nemoci kardiovaskulárního systému (Wang 2010). Současné studie se však stále snaží získat o tomto gasotransmiteru více informací a tím odhalit jeho nezastupitelné role v dalších fyziologických procesech.

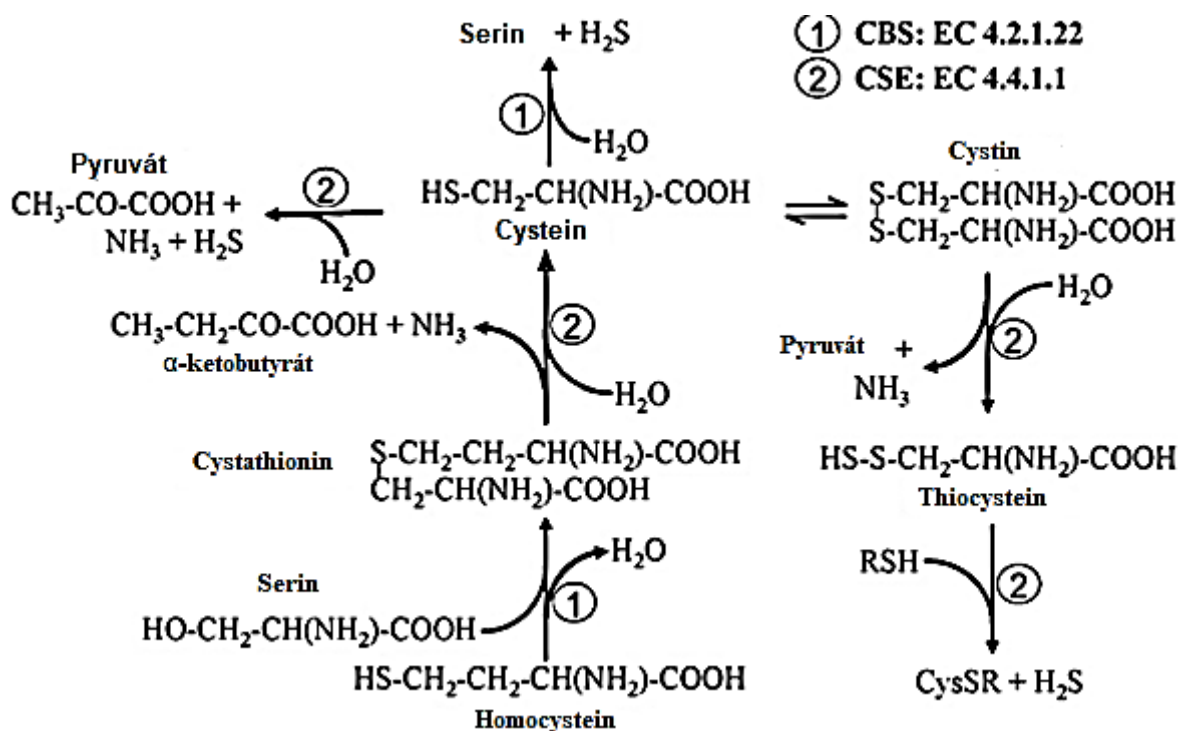
3.2.1 Vlastnosti sulfanu

Sulfan je hořlavý bezbarvý plyn, který je charakteristický svým pachem po zkažených vejcích. Může být oxidován různými činidly za vzniku oxidu siřičitého (SO_2) a kyseliny sírové (H_2SO_4) (Qu et al. 2006). Tento plyn byl po celá desetiletí známý pouze jako toxická látka znečišťující životní prostředí. Hlavním mechanismem jeho toxicity je silná inhibice mitochondriální cytochrom c oxidázy (Łowicka & Bełtowski 2007). Je také nebezpečný tím, že při inhalaci dojde v důsledku biochemických poškození dýchacích center v mozgovém kmeni ke ztrátě centrálního řízení dýchání, a proto nedojde k jeho detekci. H_2S se v těle savců při fyziologickém pH 7,4 vyskytuje přibližně z jedné třetiny jako nedisociovaný a ze dvou třetin jako hydrogensulfidový anion (HS^-) (Reiffenstein et al. 1992). Tento gasotransmitter může snadno pronikat plazmatickými membránami buněk v nedisociované formě díky své rozpustnosti v tucích (Qu et al. 2006). Sulfan se produkuje ve významném množství ve většině tkáních. Nejvyšší rychlost produkce byla zaznamenána v mozku, kardiovaskulárním systému, játrech a ledvinách (Mitchell et al. 1993; Cheng et al. 2004). Koncentrace sulfanu v organismu se příliš neliší od koncentrace, jež by mohla být pro buňky toxická, proto je zřejmé, že na buněčné úrovni probíhají velmi přesné regulační mechanismy, které mají na starost udržovat hodnotu endogenního sulfanu v normě (Wang 2002).

3.2.2 Produkce a metabolismus

Sulfan je v savcích tkáních syntetizován prostřednictvím dvou hlavních enzymů - cystathionin- β -syntázy (CBS) a cystathionin- γ -lyázy (CSE). Oba tyto enzymy jsou závislé na pyridoxal-5'-fosfátu (PLP, jde o aktivní formu vitamínu B6), který působí jako jejich kofaktor. Pro tvorbu endogenního sulfanu je využit L-cystein, jenž se desulfuruje za vzniku H_2S (Stipanuk & Beck 1982). Cystein může být pomocí CBS hydrolyzován, čímž vznikne H_2S a jako vedlejší produkt L-serin. Pro tvorbu sulfanu může být cystein hydrolyzován také CSE, vedlejším produktem je poté pyruvát a amoniak (NH_3). Pomocí CSE může být cystein převeden na thiocystein, pyruvát a NH_3 , thiocystein může být následně prostřednictvím CSE využit k tvorbě cysteinu a H_2S . Ke konverzi thiocysteinu na cystein a H_2S může ale dojít i neenzymatickou cestou (Cavallini et al. 1962). Enzymy CBS a CSE se dále podílejí na transsulfurační cestě metabolismu homocysteinu. CBS katalyzuje kondenzaci homocysteinu a serinu za vzniku cystathioninu, jenž je poté hydrolyzován CSE. Tím vznikne cystein s vedlejšími produkty α -ketobutyratem a NH_3 (viz Obr. č. 11). CSE také může převést cystein a siřičitan na L-cysteát a H_2S (Cavallini et al. 1962). CBS je schopný katalyzovat kondenzaci cysteinu a homocysteinu za vzniku cystathioninu a H_2S . Některé studie prokázaly, že produkce sulfanu touto cestou je dokonce účinnější než hydrolyza cysteinu pomocí CBS (Chen et al. 2004).

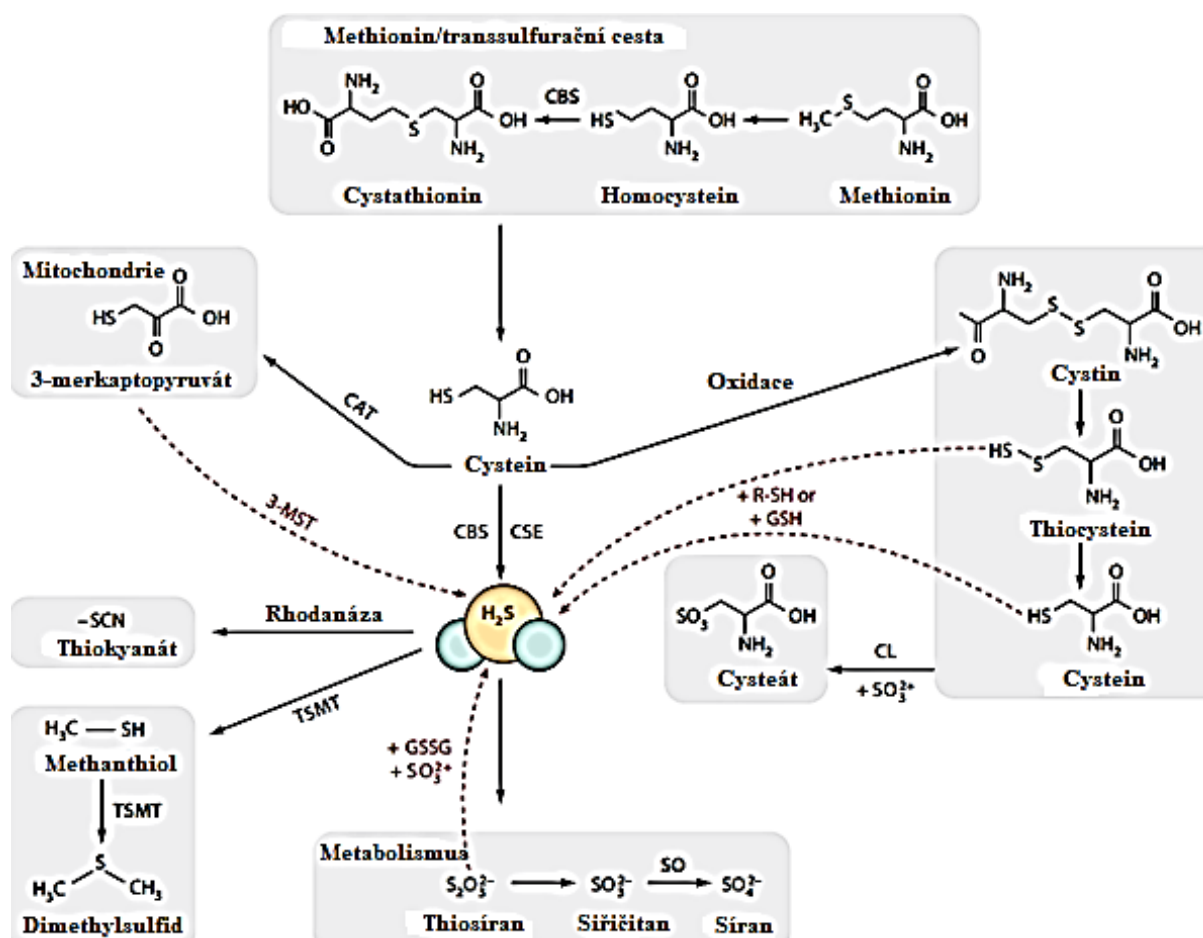
Kromě těchto cest je popsáno několik dalších možností vzniku endogenního sulfanu. Cystein může reagovat s ketokyselinami za vzniku 3-merkaptopyruvátu a příslušné aminokyseliny. Tato reakce je katalyzována dalším enzymem – cysteinaminotransferázou (CAT). 3-merkaptopyruvát lze poté desulfurovat 3-merkaptopyruvát sulfurtansferázou (3-MST) za vzniku sulfanu a pyruvátu (Julian et al. 2002).



Obrázek č. 11 - Cesta endogenní biosyntézy sulfanu. Zahrnuje působení dvou hlavních sulfan produkujících enzymů – cystathionin- β -syntázy (CBS) a cystathionin- γ -lyázy (CSE). Kromě těchto dvou enzymů existují ještě dva méně zastoupené enzymy, a to 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (3-MST) a cysteinaminotransferáza (CAT) (Qu et al. 2006).

Současné výzkumy naznačují, že hlavní cestou produkce endogenního sulfanu je působení CBS a CSE na cystein. Všechny ostatní dráhy zahrnující další enzymy a substráty budou hrát v biosyntéze sulfanu jen malou roli. V neposlední řadě je třeba zmínit, že existuje i neenzymatická cesta tvorby endogenního sulfanu. Zdrojem mohou být například thiooly či molekuly obsahující thiolovou skupinu, jejichž redukcí lze sulfan získat (Ishigami et al. 2009).

Přestože již bylo objeveno mnoho způsobů, jak lze H_2S v těle syntetizovat, méně je známo o jeho metabolismu (viz Obr. č. 12). Dnes se ví, že je H_2S součástí různých chemických a biochemických katabolických pochodů v těle. Příkladem může být vznik sulfhemoglobinu. Při zvýšeném příjmu siřičitanů ve střevě totiž dochází k reakci siřičitanů s hemoglobinem. Tímto způsobem vzniká sulfhemoglobin, který znemožňuje, aby se na hemoglobin navázal kyslík, což vede k hypoxii tkání (Arp et al. 1987). Jednou z dalších katabolických drah sulfanu je jeho oxidace probíhající v mitochondriích. Tato oxidace probíhá díky enzymům, které oxidují původní sulfan na thiosíran ($S_2O_3^{2-}$), přičemž dochází k propojení oxidace sulfanu s elektrotransportním řetězcem a tím k příspěvu tvorby ATP. Thiosíran je následně konvertován na siřičitan (SO_3^{2-}) a síran (SO_4^{2-}), které jsou následně vyloučeny z organismu. V buněčném cytosolu sulfan podléhá methylaci thiol-S-methyltransferázou (TSMT) za vzniku methanthiolu (CH_3SH) a dimethylsulfidu (CH_3SCH_3). Tyto sloučeniny se také mohou vázat s hemoglobinem a utvořit tak výše zmiňovaný sulfhemoglobin. V neposlední řadě může být (především v tlustém střevě) sulfan substrátem pro rhodan, což vede ke vzniku síranu (SCN^-) a thiokyanátu, jenž je pro organismus toxický (Li et al. 2011).



Obrázek č. 12 - Biosyntéza a degradace sulfanu (H_2S) v buňkách savců. H_2S je uvnitř buňky syntetizován z cysteinu prostřednictvím cystathionin- γ -lyázy (CSE), cystathionin- β -syntázy (CBS), cysteinaminotransferázy (CAT) nebo 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázy (3-MST). Sulfan je poté v těle součástí několika metabolických cest vedoucích k jeho degradaci (Li et al. 2011).

3.3 Sulfan produkující enzymy

Jak již bylo zmíněno, mezi sulfan produkující enzymy se řadí cystathionin- β -syntáza (CBS), cystathionin- γ -lyáza (CSE), cystein aminotransferáza (CAT) a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (3-MST). Každý z těchto enzymů se vyskytuje v různých savčích tkáních. Zatímco v některých tkáních je potřeba pro tvorbu sulfanu více sulfan produkujících enzymů, v jiných postačí jen jeden z nich.

3.3.1 CBS

Cystathionin- β -syntáza je hlavním sulfan produkujícím enzymem v centrálním nervovém systému (Kimura 2010), nachází se například v astrocytech či Bergmannových buňkách. Bylo prokázáno, že koncentrace CBS v mozku je závislá na věku jedince. Zatímco v prenatálním období byly ve tkáni mozku změřeny nízké hladiny tohoto enzymu, po porodu se hodnoty CBS výrazně zvýšily. U dospělých jedinců však byly opět naměřeny nízké hodnoty (Enokido et al.

2005; Kimura 2013). CBS je dále produkován v játrech, ledvinách, tenkém střevě, pankreatických buňkách, děloze, placentě (Enokido et al. 2005; Ichinohe et al. 2005) a ve vaječnících. Zde byl CBS lokalizován nejen ve všech stádiích folikulárních buněk, ale i v buňkách granulózních (Liang et al. 2006). CBS byl také detekován ve varleti, a to konkrétně v zárodečných buňkách varlete a v Sertoliho i v Leydigových buňkách (Oi et al. 2001). CBS se mimo varlete nachází i v dalších tkáních samčího reprodukčního traktu, a to ve tkáni penisu (Huang et al. 2012) a v prostatě (Guo et al. 2012). Přítomnost CBS byla mimo jiné také prokázána v kančích spermiích (Pilsová 2019).

3.3.2 CSE

Cystathionin- γ -lyáza je nejdůležitějším sulfan produkujícím enzymem v kardiovaskulárním systému (Kimura 2010). Nachází se především v hladkosvalových buňkách cév a v kardiomyocytech (Huang et al. 2015). CSE byl také detekován v játrech, ledvinách, tenkém střevě, děloze, placentě a v menší míře v mozku (Hosoki et al. 1997; Kaneko et al. 2006; Vitvitsky et al. 2006; Patel et al. 2009). Tento enzym je součástí některých pankreatických buněk, svou roli hraje i v kožních fibroblastech, krevních lymfocytech (Wang 2002) či osteoklastech (Mo & Hua 2018). CSE byl detekován i v reprodukčním systému. U samic byl prokázán v děloze, plodových obalech a placentě (Patel et al. 2009). V samčím reprodukčním traktu dochází k jeho exprimaci například v prostatě (Guo et al. 2012), ve tkáni penisu (d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2009), v nezralých zárodečných buňkách varlete a v Sertoliho buňkách (Sugiura et al. 2005). CSE byl v neposlední řadě také detekován v kančích spermiích (Pilsová 2019).

3.3.3 3-MST

3-merkaptopyruvat sulfurtransferáza je v organismu minoritnějším sulfan produkujícím enzymem. Společně s CBS se nachází v nervové tkáni, a to především v neuronech (Wang 2010). Tento enzym byl dále detekován v ledvinách, srdci, játrech a brzlíku (Ogasawara & Tanabe 1994; Shibuya et al. 2009a; Shibuya et al. 2009b). 3-MST byl pozorován i v endoteliálních buňkách a v hladkosvalových buňkách cév (Wang 2010). V reprodukčním traktu byl 3-MST popsán ve varleti a ve tkáni prostaty (Gai et al. 2013). Expimace 3-MST byla zjištěna také u kančích spermií (Zelinková 2019).

3.4 Funkce sulfanu v organismu

V roce 1996 bylo poprvé publikováno, že sulfan zastává v organismu funkci gasotransmiteru (Abe & Kimura 1996). Po této události následovalo mnoho výzkumů zaměřených na tuto signální molekulu, přičemž různí vědečtí pracovníci začali zveřejňovat, jaké nejrůznější fyziologické role sulfan zastává (viz Obr. č. 13). Již bylo publikováno mnoho prací, které objasnily, jak by mohla nedostatečná koncentrace či naopak nadprodukce sulfanu ovlivnit patogenezi některých onemocnění (viz Tab. 2).

Endogenní sulfan ke svému účinku využívá hned několik signálních cest. V mnoha systémech savčího organismu je účinek sulfanu zprostředkován draselnými kanály, jež jsou citlivé na ATP (K_{ATP} kanály) (Cheng et al. 2004; Tang et al. 2005). Dalšími signálními cestami mohou být například vápenaté kanály typu T a L (Maeda et al. 2009; Marques-da-Silva et al. 2010), mitochondriální cytochrom c oxidáza (Li & Moore 2008) či iontové kanály TRPA 1 (Streng et al. 2008). Jakožto silné redukční činidlo může H_2S chránit sulfhydrylové skupiny proteinů před oxidací. Také může reagovat s kyslíkovými a dusíkatými radikály, jako je například peroxid vodíku (H_2O_2), peroxynitrit ($ONOO^-$) a chlornan (ClO^-) a chránit tím buňky před oxidačním stresem (Geng et al. 2004; Whiteman et al. 2004; Mitsushashi et al. 2005; Whiteman et al. 2005).

Tabulka 2 – Onemocnění, u kterých byl popsán nedostatek či nadbytek koncentrace H_2S

Onemocnění související se změnami koncentrací sulfanu v organismu	
Zvýšené hladiny H_2S	Zdroje
Downův syndrom	(Belardinelli et al. 2001; Kamoun et al. 2003)
Septický šok	(Lyons et al. 2001)
Kolitida	(Distrutti et al. 2006)
Pankreatitida	(Bhatia et al. 2005)
<i>Diabetes mellitus</i>	(Yusuf et al. 2005)
Ischemická choroba srdeční	(Zhu et al. 2007)
Chronická obstrukční plicní nemoc	(Chen et al. 2005)
Mozková mrtvice	(Qu et al. 2006)
Snížené hladiny H_2S	
Hypertenze	(Yan et al. 2004)
Plicní hypertenze	(Chen et al. 2005)
Ischemicko-reperfúzní poškození srdce	(Bian et al. 2006)
Cirhóza jater	(Doeller et al. 2005)
Alzheimerova choroba	(Eto et al. 2002)

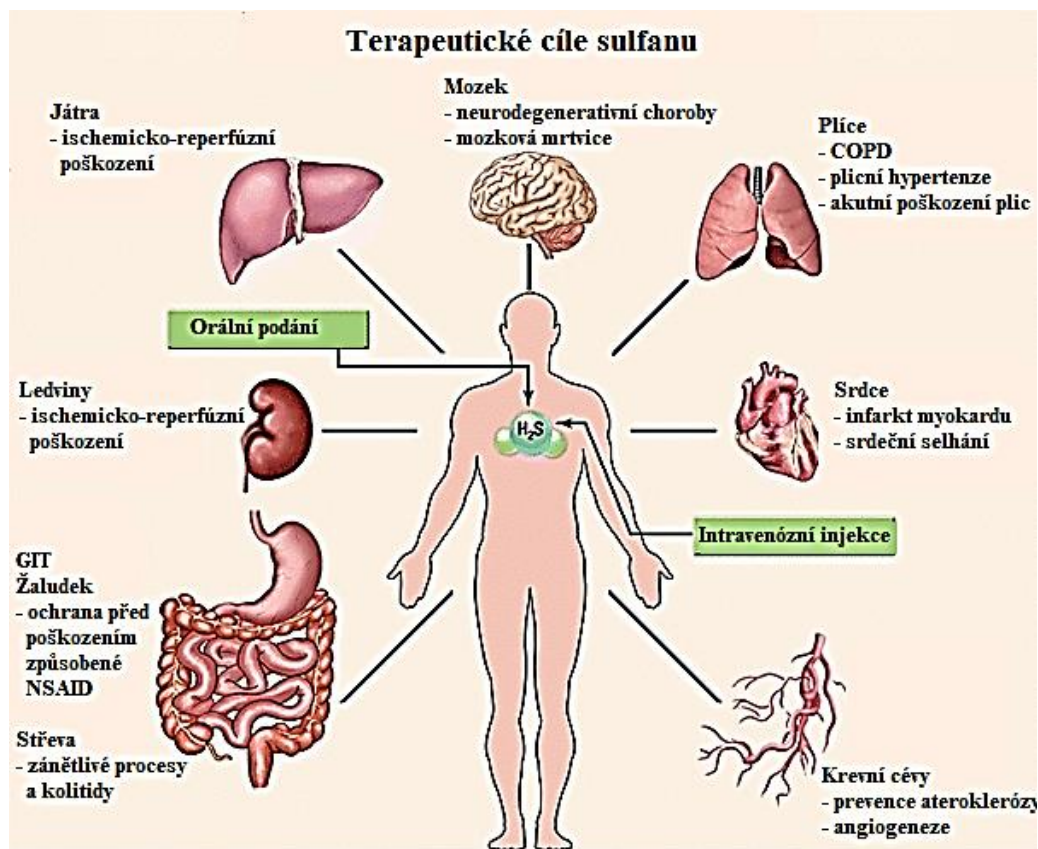
(Łowicka & Bełtowski 2007)

V nervovém systému má endogenní sulfan hned několik důležitých funkcí. Napomáhá například dlouhodobé potenciaci hipokampu a podporuje tak učení a paměťové procesy (Abe & Kimura 1996) a stimuluje přestup Ca^{2+} z extracelulárního prostoru do astrocytů (Nagai et al. 2004) a neuronů (García-Bereguiaín et al. 2008). Sulfan může za určitých podmínek také chránit neurony, proto může být jeho nedostatek škodlivý. Příkladem může být jeho ochranná funkce proti neurotoxicitě glutamátu. Nadměrné množství glutamátu je možné pozorovat při některých chorobách, jako jsou záchvaty, mozková ischemie a další (Kimura & Kimura 2004; Kimura et al. 2006). Sulfan může chránit nervové buňky před oxidačním stresem (Whiteman et al. 2004; Whiteman et al. 2005), potlačuje apoptózu, degeneraci neuronů a reguluje intracelulární pH v mikrogliích (Lu et al. 2010). Mimo jiné byla pozorována nedostatečná koncentrace H_2S u pacientů s Alzheimerovou a Huntingtonovou chorobou (Eto et al. 2002), což znamená, že by H_2S mohl posloužit jako terapeutický prostředek. Nesprávná produkce

endogenního sulfanu může však způsobit některá další onemocnění nervového systému. Tak je tomu například u pacientů s Downovým syndromem (Belardinelli et al. 2001). Nadměrná koncentrace H₂S byla také popsána při mozkové mrtvici v mozkové kůře (Qu et al. 2006).

Fyziologická role endogenního sulfanu byla popsána také v souvislosti s kardiovaskulárním systémem. Příznivé účinky H₂S byly popsány u chorob, jako je ateroskleróza, ischemická choroba srdeční a dalších onemocnění srdce (viz Obr. č. 13) (Szabó 2007; Jin et al. 2010; Wang 2011; Liu et al. 2012; Polhemus & Lefer 2014). Objevily se také známky toho, že v průběhu kardiovaskulárních chorob H₂S ovlivňuje zánětlivé a imunitní procesy. Bylo potvrzeno, že H₂S podporuje například aktivaci a množení T-lymfocytů, monocytů a apoptózu polymorfonukleárních buněk, zvyšuje adhezi a diapedézi leukocytů (Pan et al. 2017). Bylo publikováno, že snížené hladiny H₂S v plazmě jsou spojeny se zvýšeným rizikem infarktu a potažmo s vyšší mortalitou tohoto onemocnění (Zhu et al. 2007). Pokud jde o samotný myokard, bylo zjištěno, že zvýšené hladiny H₂S vedou k ochranně srdce proti ischemické chorobě srdeční a srdečnímu selhání (Pan et al. 2012; Pan et al. 2017). Geng (2004) také publikoval, že sulfan snižuje kontraktilitu myokardu. Ali (2016) naproti tomu potvrdil, že u pacientů s akutním onemocněním myokardu se koncentrace endogenního sulfanu v plazmě významně zvýšila. V posledních letech se prokázalo, že H₂S je schopen zprostředkovávat angiogenezi, která vede ke zvýšení toku krve a podporuje obnovu srdce, a tak dokáže po srdečním selhání zlepšit srdeční funkce (Givvimani et al. 2011; Polhemus et al. 2013). H₂S navíc snižuje krevní tlak plicních cév (Feng et al. 2017). Nedávné studie naznačily, že nesprávné fungování CSE či snížená hladina endogenního sulfanu je spojena s aterosklerózou (Wang 2009; Mani et al. 2014). Nicméně exogenně podaný sulfan chrání před rizikovými faktory aterosklerózy, jako je například hyperhomocysteinémie a cytotoxicita vyvolaná kyslíkovými radikály. H₂S má také vasorelaxační účinky (Zhao et al. 2001). Bylo prokázáno, že pacienti trpící hypertenzí mají snížené hladiny endogenního sulfanu (Cheung et al. 2007). Kram (2013) navíc prokázal, že H₂S má i antitrombotické účinky.

Pokud jde o zánětlivý proces, zde hraje sulfan velmi složitou roli. Může mít totiž pro- i protizánětlivé účinky (Li et al. 2006; Łowicka & Bełtowski 2007; Szabó 2007). Při experimentálních modelech septického šoku může být sulfan nadměrně produkován a může tím proto přispívat k hypotenzi, ke zhoršené kontrakci myokardu a tím k poškození plic a jater (Hui et al. 2003; Li et al. 2005; Zhang et al. 2006). Potlačení produkce H₂S v tomto případě snižuje zánětlivou reakci a zlepšuje přežití těchto modelů. Na druhou stranu někteří vědečtí pracovníci věří, že sulfan má i prozánětlivé účinky (Bhatia 2009). Bylo popsáno, že koncentrace H₂S se zvyšuje při endotoxickém a septickém zánětu, pankreatidě a hemoragickém šoku (Mok et al. 2004; Bhatia et al. 2005; Li et al. 2005). H₂S také podporuje hojení vředů u potkanů (Meng et al. 2007) a snižuje plicní edém (Geng et al. 2004). Existuje názor, že pro- a protizánětlivý účinek sulfanu závisí na rychlosti uvolnění H₂S, což je dáno použitým donorem sulfanu. Pokud se využije jako donor NaHS, dojde k rychlému uvolnění H₂S ve vysokých koncentracích, poté se zvýší syntéza prozánětlivých faktorů. Pokud se však využije jako donor sulfanu GYY4137, H₂S se uvolňuje pomalu a dojde ke zvýšení syntézy protizánětlivého chemokinu IL-10 a k utlumení produkce prozánětlivých mediátorů (Whiteman et al. 2010)

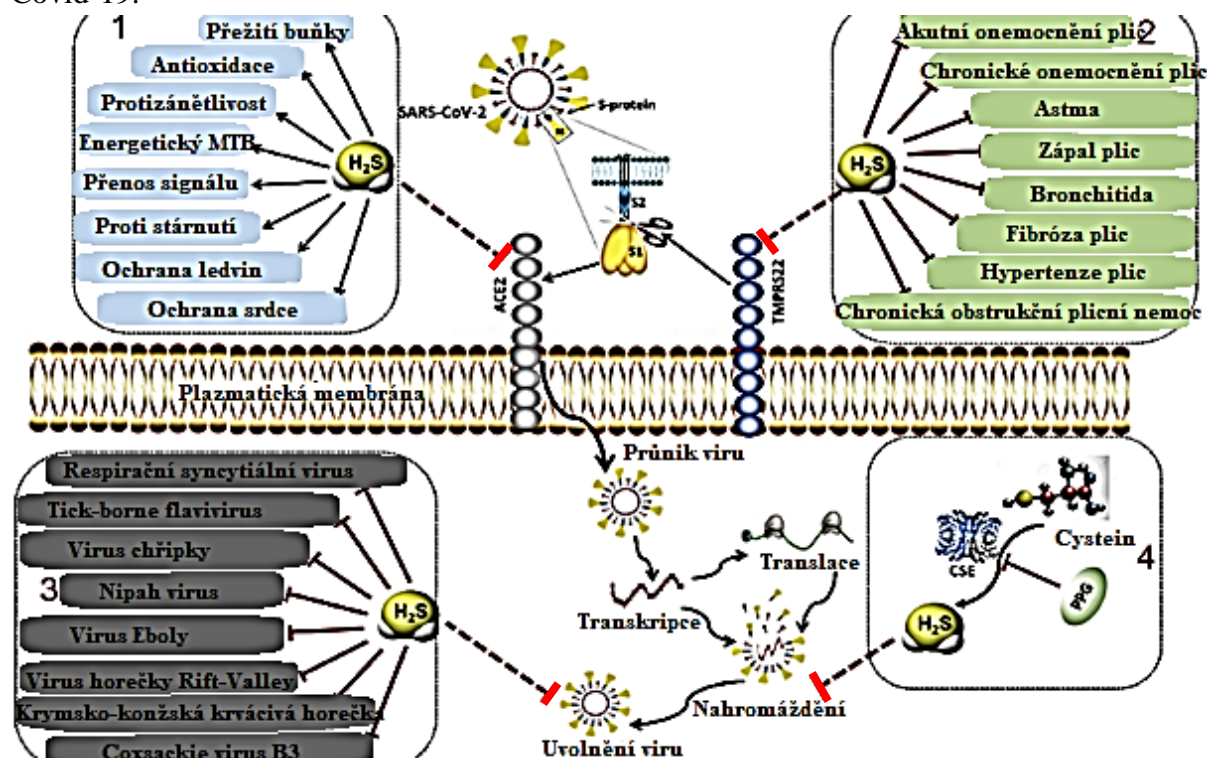


Obrázek č. 13 - Sulfan (H_2S) a jeho funkce v organismu. Sulfan se v gastrointestinálním traktu (GIT) podílí na léčbě zánětlivých onemocnění střev a kolitid, také chrání žaludek před poškozením, jenž může být způsobené nesteroidními protizánětlivými léky (NSAID). H_2S také chrání před ischemicko-reperfúzním poškozením ledvin a jater. Endogenní sulfan má mnoho funkcí i v centrálním nervovém systému a nyní se zkoumá, jak by mohl pomoci při léčbě některých neurodegenerativních onemocnění, také může snižovat riziko cévní mozkové příhody. Svou roli hraje sulfan u různých plicních nemocí, jako je například chronická obstrukční plicní nemoc (COPD) a plicní hypertenze, avšak snižuje i riziko akutního poškození plic. V neposlední řadě má svoji funkci i v kardiovaskulárním systému. H_2S snižuje riziko srdečního selhání, infarktu myokardu, aterosklerózy a podporuje angiogenezi. V současné době se pracuje na vývoji léčiv na bázi sulfanu, léky by bylo možné podávat orálně či intravenózně (Predmore & Lefer 2010).

Z různých vědeckých prací je možné přepokládat, že sulfan je esenciální také pro fyziologickou funkci plic. V dýchacím systému je důležitý při zánětlivých procesech, navíc chrání buňky proti oxidačnímu stresu (Chen & Wang 2012; Madurga et al. 2015; Jiang et al. 2019; Guan et al. 2020). Je popsáno, že exogenně podaný sulfan chrání plíce před různými nemocemi, jako je akutní či chronické onemocnění plic, astma, chronická obstrukční plicní nemoc, fibróza plic a hypoxie způsobená plicní hypertenzí (Feng et al. 2017; Perry et al. 2018). Nakonec je třeba zmínit, že byla prokázána funkce sulfanu při inhibici replikace některých RNA virů způsobující plicní onemocnění (Li et al. 2015; Bazhanov et al. 2017).

Podle výsledků nedávných studií je možné, že by H_2S mohl být využit při léčbě onemocnění Covid-19, a to speciálně u rizikových skupin, jako jsou jedinci

s kardiovaskulárními chorobami, diabetici či pacienti s poruchami ledvin. H₂S může proti tomuto respiračnímu onemocnění bojovat více způsoby. Zprvé, je možné, aby H₂S zablokoval viru SARS-CoV-2 vstup do hostitelské buňky prostřednictvím interakce s angiotenzin konvertujícím enzymem 2 (ACE2) a s transmembránovou serin proteázou 2 (TMPRSS2), což jsou klíčové molekulární cíle tohoto viru, bez kterých do hostitelské buňky nepronikne (Lukassen et al. 2020; Yuan et al. 2020). Zadruhé, sulfan dokáže inhibovat replikaci viru, brání totiž nashromáždění viru a jeho následnému uvolnění (Li et al. 2015; Bazhanov et al. 2017). Zatřetí, H₂S dokáže potlačit imunitní reakci a rozvoj zánětu, čímž může ochránit plíce před poškozením (viz Obr. č. 14) (Yang 2020). S ohledem na všechna tato zjištění lze předpokládat, že by endogenní sulfan mohl být využit jako prevence či přímo jako léčba onemocnění Covid-19.



Obrázek č. 14 - Možné cesty, na nichž jsou založeny ochranné funkce sulfanu (H₂S) při onemocnění Covid-19. Sulfan poskytuje ochranu před různým poškozením orgánů (rámeček 1). H₂S se rovněž jeví užitečný při některých plicních chorobách (rámeček 2) a při inhibici replikace RNA virů (rámeček 3). CSE či exogenně podaný sulfan může působit proti rozvinutí akutního respiračního syndromu Covid-19 (rámeček 4) zabráněním vniknutí viru do hostitelské buňky prostřednictvím interakce s angiotenzin konvertujícím enzymem 2 (ACE2) a transmembránovou serin proteázou 2 (TMPRSS2), dále inhibicí replikace viru a ochráněním plic před poškozením tím, že potlačí imunitní reakce a vývoje zánětu. Tečkovaná čára znázorňuje předpověď a červená čára představuje blokadu (Yang 2020)

Endogenní sulfan má několik důležitých rolí i v gastrointestinálním traktu (GIT). Objevily se spekulace, že H₂S snižuje žaludeční sekreci (Mard et al. 2014), podporuje integritu žaludeční sliznice (Ise et al. 2011) a kontrakci hladkých svalů ve stěně žaludku u myši a morčat (Berg et al. 2004). Další studie prokázaly, že sulfan má v některých částech trávicího traktu

stimulační efekt na motilitu GIT, v jiných naopak inhibiční. To je dáno koncentrací H₂S a využitou signální cestou (Huang et al. 2013; Medeiros et al. 2012). Další funkcí sulfanu v GIT je jeho schopnost posilovat reparační procesy probíhající na sliznici, navíc podporuje léčbu žaludečních vředů (Wallace et al. 2007). Guo et al. (2014) také prokázal, že sulfan zabraňuje apoptóze žaludečních buněk při ischemicko reperfúzním poškození. Fiorucci et al. (2005) nedávno prokázal, že H₂S se nachází i v játrech a že zde snižuje vazokonstrikci cév. Exprimace CSE byla pozorována v hepatocytech a Itóových buňkách, je tedy možné, že sulfan způsobuje vasorelaxaci jaterních sinusoid prostřednictvím relaxace izolovaných Itóových buněk. Pokud však dojde k cirhóze jater, koncentrace H₂S se sníží a nedochází tak k dostatečnému vasorelaxačnímu účinku, což může přispět k rozvoji hypertenze portální žíly (García-Tevijano et al. 2001).

Pokud jde o funkci sulfanu v endokrinním systému, i zde zastává sulfan určitou funkci. Prostřednictvím K_(ATP) kanálů totiž snižuje sekreci inzulínu v pankreatických β-buňkách (Yusuf et al. 2005; Jacobs et al. 1998; Yang et al. 2005). Tato data naznačují, že produkce H₂S ve slinivce by mohla pomoci regulovat uvolňování inzulínu a že abnormální syntéza sulfanu by mohla mít podíl na nedostatečném uvolňování inzulínu při onemocnění *diabetes mellitus*. Mimo pankreas H₂S ovlivňuje sekreci hormonu uvolňujícího kortikotropin (CRH), je proto možné, že sulfan by mohl mít důležitou roli i v regulaci hypothalamo-hypofyzární osy zapojené do stresové reakce (Dello Russo et al. 2000).

3.5 Funkce sulfanu v reprodukci

Sulfan produkující enzymy byly mimo již zmíněné orgánové soustavy detekovány také v samčím a samičím reprodukčním traktu (Sugiura et al. 2005; Liang et al. 2006; d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2009; Patel et al. 2009; Srilatha et al. 2009).

Některé studie již dříve naznačovaly, že CSE i CBS jsou důležitými enzymy v samičí reprodukci. Bylo zjištěno, že myši mající knockautovaný CSE jsou fertillní a jsou schopny porodit potomky (Yang et al. 2008). Zatímco samičí potomstvo myši s knockautovaným CBS mělo horší plodnost, samčí potomci zůstali zcela fertillní (Watanabe et al. 1995). Tato studie naznačuje, že CBS je důležitý hlavně pro reprodukci samic. CBS byl nalezen například ve vaječniku, kde byl lokalizován hlavně ve folikulárních a kumulárních buňkách (Liang et al. 2006). Nedostatek CBS u samic mělo za následek menší počet dozrálých folikulů, kratší a nepravidelný reprodukční cyklus a zkrácenou dobu mezi estrem a diestrem. U těchto samic byly také pozorovány dramatické poklesy živě narozených plodů (Guzmán et al. 2006). Potenciální role CBS byla popsána i při zrání oocytů. CBS byl totiž detekován v granulózních buňkách a pokud došlo ke snížení jeho koncentrace, došlo i k utlumení meiotického zrání oocytů (Liang et al. 2007). Nejvyšší hladina sulfanu byla pozorována ve zralých oocytech, u kterých zatím neproběhl proces stárnutí. V oocytech, jenž byly vystaveny stárnutí, po 24 hodinách významně klesla hladina H₂S v porovnání se zralými oocyty, které procesu stárnutí vystaveny nebyly. Ve stejné studii bylo prokázáno, že snížení produkce endogenního H₂S vede ke zrychlenému stárnutí oocytů. Při podání exogenního sulfanu jsou oocyty před stárnutím naopak chráněny (Krejčová et al. 2015).

Kromě již zmíněných orgánů byla přítomnost sulfan produkujících enzymů zjištěna v děloze, vagíně, placentě a v plodových obalech, konkrétně v amnionu a chorionu (Srilatha et

al. 2006; Patel et al. 2009). V závislosti na těchto výsledcích se zkoumalo, zda má H₂S vasorelaxační účinky na myometrium. Při podání NaHS nebo L-cysteinu došlo k očekávanému snížení kontrakcí myometria, z čehož lze usoudit, že sulfan je během březosti zapojen do udržení klidového stavu dělohy (Patel et al. 2009) a že endogenní sulfan pravděpodobně zasahuje i do dalších funkcí samičího rozmnožování (Sidhu et al. 2001; Wray et al. 2001). Další výzkumníci detekovali přítomnost CBS i CSE například v hladkosvalových buňkách a endotelu pupečních tepen a žil (Zhu et al. 2011) nebo v hladké svalovině kavernózního tělesa v klitorisu králíka (Srilatha et al. 2009).

Sulfan produkující enzymy byly zjištěny i v samčím reprodukčním traktu. Oba enzymy byly detekovány ve varlatech potkanů (Sugiura et al. 2005). CSE byl lokalizován v Sertoliho buňkách a v nezralých zárodečných buňkách, zatímco CBS se nacházel v Sertoliho, v Leydigových a v zárodečných buňkách varlete (Oi et al. 2001). Následná studie také prokázala, že H₂S chrání varlata před zánětlivými procesy a před oxidačním stresem (Wang et al. 2018). Sulfan byl nalezen i v prostatě, ve které má tento gasotransmitter nejspíš vliv na rozvoj některých chorob postihující prostatu, jako je například nezhoubná hyperplazie prostaty či rakovina prostaty (Guo et al. 2012).

Jedním z nejpozoruhodnějších zjištění byl fakt, že v samčím reprodukčním traktu endogenní sulfan usnadňuje erekci penisu. Srilatha et al. (2006) prokázal, že u primátů intramuskulární injekce NaHS prodlužuje délku penisu a zvyšuje intramuskulární tlak. Naproti tomu inhibice CSE u potkanů snižuje tlak v kavernózních tělesech. Proerекtilní funkce H₂S byla později potvrzena stejnými autory u králíků, u nichž zjistili, že NaHS uvolňuje topořivá tělesa, zatímco při inhibici CBS i CSE dochází ke značné kontraktilitě těchto struktur (Srilatha et al. 2007). Později byla exprese CBS i CSE rovněž detekována u lidské tkáně penisu. CSE byl nazelen v trámčité svalové tkáni, v hladké svalovině cév a v periferních nervech penisu, zatímco CBS byl lokalizován hlavně v trámčité svalové tkáni. Tato zjištění naznačují, že sulfan by mohl být dalším terapeutickým prostředkem při léčbě erektilní dysfunkce (Shukla et al. 2009).

Koncentrace endogenního sulfanu byly další skupinou vědeckých pracovníků měřeny v seminální plazmě subfertilních a neplodných mužů (Wang et al. 2018). Cílem této studie bylo objasnit, zda nebo jakým způsobem sulfan ovlivňuje funkci lidských spermií. Bylo zjištěno, že koncentrace H₂S v seminální plazmě byla významně nižší u neplodných jedinců. Tato nízká hladina byla prokázána hlavně u oligoasthenozoospermických (ejakulát se sníženou koncentrací a motilitou spermií) a asthenospermických (ejakulát se sníženou motilitou spermií) pacientů. U asthenospermických jedinců byla prokázána nižší aktivita CBS, avšak CTH se jevil být v normě. Při následné inhibici CBS navíc spermie vykazovaly ještě horší motilitu. Spermie byly poté vystaveny účinku dvou různých donorů sulfanu – GYY4137, který uvolňuje sulfan pomalu a v nižších koncentracích, nebo NaHS, při jehož použití dojde k rychlému uvolnění H₂S ve vysokých koncentracích. Při dodání GYY4137 došlo ke zlepšení motility spermií, při použití NaHS však ke kýženému efektu nedošlo, pohyblivost spermií naopak byla ještě nižší než při podání inhibitoru CBS. Wang et al. (2018) vyslovil hypotézu, že tento kontrastní účinek mezi donory sulfanu by mohl být dán právě rozdíly v rychlostech a koncentracích uvolňujícího se sulfanu. U asthenospermických pacientů bylo možné zlepšit sníženou motilitu exogenním podáním sulfanu, ale k tomu došlo pouze v případě, že v seminální plazmě byly hodnoty sulfanu nižší, než je jeho fyziologická norma.

Další studie se zaměřila na spermie a jejich možnou ochranu před oxidačním stresem pomocí sulfanu. V tomto výzkumu byl využit jak NaHS jakožto donor rychle uvolňující H_2S , tak GYY4137, jenž uvolňuje H_2S pomalu. Bylo zjištěno, že tyto donory sulfanu mají zcela odlišné antioxidační vlastnosti. GYY4137 dokáže zachovat motilitu spermií navzdory působení oxidačního stresu, účinky NaHS jsou však značně závislé na aplikované dávce. Při nižších koncentracích i tento donor dokáže zachovat motilitu spermií, ale při vyšších dávkách se ukázal jako cytotoxický. Nicméně bylo potvrzeno, že NaHS i GYY4137 částečně zmírňují škody způsobené oxidačním stresem (Pintus et al. 2020).

Na závěr je třeba říct, že sulfan produkující enzymy již byly prokázány v ejakulovaných i v kapacitovaných spermiích. Enzymy byly detekovány především v bičíku a u ejakulovaných spermií také v akrozomu. Intenzita signálu CSE byla oproti ejakulovaným spermiím nižší v kapacitovaných spermiích. Z toho lze odvodit, že sulfan se nejspíš účastní i samotného procesu kapacitace a akrozomální reakce (Pilsová 2019).

4 Metodika

4.1 Použité chemikálie a média

Jako kapacitační médium bylo použito médium TL-HEPES-PVA. Přesné složení kapacitačního média je popsáno v tabulce 3. Všechny složky média byly rozpuštěny v 250 ml ultra čisté H₂O.

V průběhu experimentů byl jako pufrovací roztok využit PBS (Phosphate buffered saline; 0,01 M fosfátový pufr; 0,0027 M KCl; 0,137 M NaCl; pH 7,4; Sigma-Aldrich, USA). Pro vizualizaci akrozomu spermií byl použit PNA lektin konjugovaný s rhodaminem (Vector Laboratories, USA) a pro vizualizaci jádra spermií bylo použito montovací médium Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, USA).

Tabulka 3 – Složení 250 ml kapacitačního média TL-HEPES-PVA

BASIC TL-HEPES	
Množství	Složka
1,6585 g	NaCl (Sigma-Aldrich, USA)
0,05965 g	KCl (Sigma-Aldrich, USA)
0,0102 g	NaH ₂ PO ₄ (Sigma-Aldrich, USA)
0,35 ml	Laktát sodný (Sigma-Aldrich, USA)
0,02545 g	MgCl ₂ · 6H ₂ O (Sigma-Aldrich, USA)
0,59575 g	HEPES (Sigma-Aldrich, USA)
0,0055 g	Pyruvát sodný (Sigma-Aldrich, USA)
0,5465 g	Sorbitol (Sigma-Aldrich, USA)
0,00625 g	Gentamicin (Sigma-Aldrich, USA)
0,01625 g	Penicilin (Sigma-Aldrich, USA)
0,025 g	Poly(vinyl-alcohol) (Sigma-Aldrich, USA)

Pro následnou kapacitaci muselo být pH kapacitačního média upraveno na 7,3–7,4, prostřednictvím pH metru (inoLAB, Česká republika). Následně bylo do 50 ml kapacitačního média přidáno 0,099 g glukózy, 0,0275 g pyruvátu sodného, 1 g BSA, 0,0084 g NaHCO₃ a 0,0147 g CaCl₂ · 2H₂O.

Pro imunofluorescenci byly využity primární protilátky – králičí polyklonální anti-CBS (CBS Polyclonal Antibody; ředění 1:100; ThermoFisher Scientific, USA) a anti-MST (MPST Polyclonal Antibody; ředění 1:200; ThermoFisher Scientific, USA) a myší monoklonální anti-CSE (Monoclonal Anti-CTH, clone 4E1-1B7 antibody, purified immunoglobulin; ředění 1:700; Sigma-Aldrich, USA). Jako sekundární protilátka byla v pokusech použita polyklonální anti-rabbit (Goat anti-Rabbit IgG (H+L), SuperclonalTM Recombinant Secondary Antibody, Alexa Fluor 488; ThermoFisher Scientific, USA) a anti-mouse (Goat anti-Mouse IgG (H+L) SuperclonalTM Recombinant Secondary Antibody, Alexa Fluor 488; ThermoFisher Scientific, USA), obě konjugované s Alexa Fluor 488. Pro metodu Western blot byly využité tytéž primární protilátky, jako sekundární protilátka byla použita anti-rabbit (Goat anti-Rabbit IgG (L+H), Horseradish Peroxidase-Linked; Bio-Rad, USA) a anti-mouse (Goat anti-Mouse IgG

(L+H), Horseradish Peroxidase-Linked; Bio-Rad, USA), obě konjugované s křenovou peroxidázou.

Pro průkaz proteinů metodou Western blot byl využit 15% separační gel a 4% zaostřovací gel. Složení separačního gelu je znázorněno v tabulce 4, složení zaostřovacího gelu je popsáno v tabulce 5. Pro elektroforézu byl připraven elektroforetický pufr (ELFO pufr) ve složení 15 g Tris (Sigma-Aldrich, USA), 72 g glycinu (Sigma-Aldrich, USA), 5 g SDS (Bio-Rad, USA) v 1 l destilované vody. Pufr byl následně zředěn 1:4 s destilovanou vodou. Pro elektroblotting byl využit blotovací pufr ve složení 3,03 g Tris, 14,4 g glycinu, 800 ml destilované vody, 200 ml methanolu (Sigma-Aldrich, USA).

Tabulka 4 – Složení 15% separačního gelu pro Western blot

15% separační gel	
Množství	Složka
2,5 ml	Destilovaná H ₂ O
2,5 ml	Pufr (1,5 M Tris. HCl, pH 8,8; Bio-Rad, USA)
5 ml	30% roztok akrylamidu/bis-akrylamidu (Bio-Rad, USA)
100 µl	10% SDS (Bio-Rad, USA)
4,5 µl	TEMED (Cytiva, USA)
70 µl	10% persíran amonný (Bio-Rad, USA)

Tabulka 5 – Složení 4% zaostřovacího gelu pro Western blot

4% zaostřovací gel	
Množství	Složka
1,52 ml	Destilovaná H ₂ O
0,625 ml	Pufr (0,5 M Tris. HCl, pH 6,8; Bio-Rad, USA)
0,325 ml	30% roztok akrylamidu/bis-akrylamidu (Bio-Rad, USA)
0,025 ml	10% SDS (Bio-Rad, USA)
3,8 µl	TEMED (Cytiva, USA)
50 µl	10% persíran amonný (Bio-Rad, USA)

4.2 Příprava vzorků

V experimentech byl použit nativní ejakulát odebraný od kanců plemene Duroc z inseminační stanice Skršín. Při ředění a přípravě ejakulátu pro vlhkou fixaci se po celou dobu pracovalo s PBS ohřátým na 38 °C.

Do dvou zkumavek typu Falcon byl ihned po dovezení dávek odebrán 1 ml ejakulátu a zkumavky byly doplněny 9 ml PBS. Následně byla provedena centrifugace (Hettich Mikro 22R; DJB Labcare, Velká Británie) při 300 x g a 30 °C po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant byl odstraněn, objem zkumavek byl doplněn do 10 ml PBS. Celý tento proces byl ještě dvakrát zopakován. Jedna ze zkumavek byla po poslední centrifugaci doplněna do 10 ml PBS, druhá kapacitačním médiem TL-HEPES-PVA. Takto připravené vzorky byly resuspendovány. Po ukončeném promývání ejakulátu byla provedena kontrola koncentrace spermií pomocí

Bürkerovy komůrky. Pokud byla koncentrace nevyhovující, byl vzorek upraven na výslednou koncentraci 5×10^7 spermii/ml.

Vzorky s kapacitačním médiem byly rozpipetovány do mikrozkušavek Eppendorf® po 1 ml. Tímto způsobem byly vytvořeny čtyři skupiny vzorků s rozdílnou dobou kapacitace (30 minut, 60 minut, 90 minut a 120 minut), které byly vloženy do CO₂ inkubátoru (Sanyo MCO-19AIC; Marshall Scientific, USA) o teplotě 38 °C a 5 % CO₂ na požadovanou dobu kapacitace. Jeden ze vzorků s kapacitačním médiem, který byl použit jako kontrola (kapacitace 0 minut), nebyl do CO₂ inkubátoru vůbec vložen. Následně byly jednotlivé vzorky dvakrát centrifugovány (Labnet International, Inc., USA) při 300 x g, po každé centrifugaci byl odsán supernatant, objem byl doplněn PBS do 1 ml a vzorky byly resuspendovány.

U všech vzorků byla pod světelným mikroskopem (Nikon YS100; Nikon, Japonsko) provedena kontrola koncentrace spermii v suspenzi pro přípravu preparátů na mikroskopická skla pro fluorescenční mikroskopii. Pokud byla v suspenzi vysoká koncentrace spermii, bylo přidáno PBS, pokud bylo naopak spermii v suspenzi málo, vzorek byl znovu odstředěn a následně byl snížen objem PBS.

Před samotnou vlhkou fixací spermii bylo třeba na mikroskopická skla nakreslit dvě kolečka pomocí PAP Pen Liquid Blocker (Sigma-Aldrich, USA). Do každého takto připraveného kolečka bylo nanášeno 20 µl suspenze spermii v PBS a 50 µl vymraženého roztoku acetonu a methanolu (LACH-NER s. r. o., Neratovice) v poměru 1:1. Jedno kolečko bylo připraveno pro reakci s protilátkou, druhé sloužilo jako negativní kontrola. Preparáty byly poté inkubovány 5 minut při pokojové teplotě, následně byly omyty PBS a nechaly se zaschnout. Takto zpracované vzorky byly uskladněny v lednici a byly připravené pro imunodetekci.

4.3 Imunofluorescenční stanovení sulfan produkujících enzymů

Jednotlivé preparáty se spermii byly omyty PBS a inkubovány v kyvetě s vymraženým acetonem po dobu 10 minut. Vzorky byly poté opět omyty PBS a bylo na ně nanášeno 150 µl SuperBlock (ThermoFisher Scientific, USA). Následovala inkubace při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Po opláchnutí PBS byly vzorky inkubovány se 100 µl primární protilátky králičí anti-CBS ředěnou 1:100 s PBS, králičí anti-MST ředěnou 1:200 s PBS a myší anti-CSE ředěnou 1:700 s PBS. Následovala dvouhodinová inkubace při pokojové teplotě ve vlhké komůrce. Primární protilátka byla nanášena pouze do experimentu, pro negativní kontrolu bylo využito 100 µl PBS.

Po opláchnutí preparátů následovala inkubace se 100 µl sekundární protilátky anti-rabbit konjugovanou s Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, USA) ředěnou 1:300 s PBS nebo anti-mouse také konjugovanou s Alexa Fluor 488 a ředěnou 1:300 s PBS. Sekundární protilátky byly tentokrát nanášeny jak na experiment, tak na negativní kontrolu. Následovala inkubace 60 minut ve tmě při pokojové teplotě ve vlhké komůrce. Poté byly vzorky omyty PBS a destilovanou vodou a na sklíčka bylo následně nanášeno 100 µl PNA lektinu konjugovaného s rhodaminem (Vector Laboratories, USA), jenž byl naředěn v poměru 1:700 s PBS, inkubace trvala 30 minut ve tmě při pokojové teplotě ve vlhké komůrce.

Na závěr byly preparáty omyty PBS a destilovanou vodou a po osušení bylo aplikováno 10 µl montovacího média Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, USA). Vzorky byly

překryty krycími skly a zafixovány lakem na nehty. Takto připravené vzorky byly uchovány při teplotě 4 °C a následně snímány konfokálním mikroskopem (Zeiss LSM 800, Německo) při zvětšení 630krát. Intenzita signálu stanovená jako průměrná intenzita signálu v jednotlivých spermích byla hodnocena pomocí počítačové analýzy obrazu NIS-Elements AR 4.30.01 (Nikon, Japonsko).

4.4 Stanovení sulfan produkujících enzymů metodou Western blot

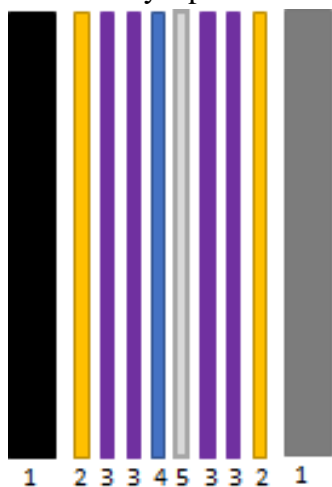
Pro SDS elektroforézu byly použity již dříve připravené promyté ejakulované spermie a kapacitované spermie s rozdílnou dobou kapacitace (0, 30, 60, 90 a 120 minut) bez supernatantu. Vzorky byly zlyzovány za použití 100 µl 2x koncentrovaného vzorkového pufru pro elektroforézu (2 ml glycerol; 4 ml 10% SDS; 1,6 ml 0,5M TRIS.HCl, pH 6,8; 0,5 mg bromfenolová modř; doplněno do 10 ml destilovanou vodou). Takto připravené vzorky byly uchovány v ledu po dobu 1 hodiny a během této hodiny byly každých 5 minut vortexovány. Vzorky byly následně po dobu 5 minut povařeny a poté centrifugovány při 10 000 x g 5 minut. Připravené vzorky byly uchovány v mrazáku při teplotě -20 °C nebo byly ihned využity pro SDS elektroforézu.

Pro Western blot byla sestavena aparatura Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, USA) a následně byl připraven roztok pro 15% separační gel. Roztok byl nalit mezi skla a převrstven destilovanou vodou. Po 30minutové polymeraci byla voda z povrchu gelu vylita a na separační gel byl navrstven 4% zaostřovací gel. Následně byly mezi skla umístěny hřebínky pro tvorbu jamek. Gel se po 15minutové polymeraci umístil do aparatury pro elektroforézu. Hřebínky byly z gelu odstraněny a do vzniklých jamek byly aplikovány připravené proteinové vzorky po 14 µl do každé jamky a proteinové molekulové standardy (Precision Plus Protein Dual Color Standards; Bio-Rad, USA) po 2 µl. Aparatura byla zalita ELFO-pufrem a následovala elektroforéza nejdříve při elektrickém napětí 80 V po dobu 20 minut, poté při elektrickém napětí 120 V po dobu jedné hodiny.

Po elektroforéze byl proveden elektroblotting. Pro tuto metodu byl připraven gel se separovanými proteiny, filtrační papír Whatman (Chromatography paper; GE Healthcare, USA), PVDF membrána (ThermoFisher Scientific, USA) a houbičky. Jednotlivé části byly po dobu 15 min namočený v blotovacím pufru a následně byly seskládány do kazety (viz Obr. č. 15). Kazeta byla vložena do aparatury pro elektroblotting, aparatura byla zalita blotovacím pufram a byla připojena ke zdroji o elektrickém proudu 500 mA. Přenos probíhal 1,5 hodiny, poté byla kazeta vyjmuta, membrána byla opláchnuta v destilované vodě a obarvena Ponceau (Ponceau S solution; Sigma-Aldrich, USA) pro vizualizaci proteinů. Tato membrána byla následně použita pro imunodetekci.

Nejprve proběhla deaktivace volných vazebných míst na membráně pomocí 5% sušeného mléka (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk; Bio-Rad, USA) rozpuštěného v PBS při laboratorní teplotě po dobu jedné hodiny. Poté byla membrána promyta a to 2x po 5 minutách v PBS s 0,1% Tweenem 20 (Merck; Německo) na rotační třepačce (MC-T6-Pro; LABtechnik, s.r.o., Brno). Následovala inkubace se specifickými primárními protilátkami - králíčí polyklonální anti-CBS a anti-MST ředěnými 1:1000 s PBS a s myší monoklonální primární protilátkou anti-CSE ředěnou taktéž 1:1000 s PBS. Inkubace probíhala

po dobu 1 hodiny a 30 minut. Pro zjištění koncentrace nanesených proteinů byly membrány inkubovány s protilátkou anti-mouse proti alfa-tubulinu (Sigma-Aldrich, USA).



Obrázek č. 15 - Složení blotovací kazety pro Western blot. 1 - kazety, 2 - houbičky, 3 - filtrační papír Whatman, 4 - gel, 5 - membrána.

Následně byla membrána promyta 3x po dobu 10 minut v PBS s 0,1% Tweenem 20 a poté byla inkubována se sekundární protilátkou anti-rabbit nebo anti-mouse, obě protilátky byly ředěny 1:3000 s PBS. Po hodinové inkubaci při laboratorní teplotě byla membrána 4x po 5 minutách omyta v PBS s 0,1% Tweenem 20 a 2x po 5 minutách v PBS.

Následovala vizualizace detekce proteinů protilátkou pomocí elektrogenované chemiluminiscence. Na membránu byl nanesen chemiluminiscenční substrát (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; ThermoFisher Scientific, USA) a detekce proběhla v přístroji Azure c600 (Azure Biosystems; Biocev, Vestec). Výsledky detekce proteinů byly zpracovány denzitometrií v programu Image Studio Lite Verze 5.2. (LI-COR Biosciences, USA).

4.5 Statistická analýza

Detekce enzymů pomocí imunofluorescence byla třikrát zopakována a s využitím analýzy obrazu byly získány hodnoty průměrné intenzity signály. Tyto hodnoty byly podrobeny statistické analýze rozptylu ANOVA s jednofaktorovým výběrem v programu Statistica 12 (StatSoft CR s.r.o., Česká republika). Hladina statistické významnosti odpovídala $p < 0,05$.

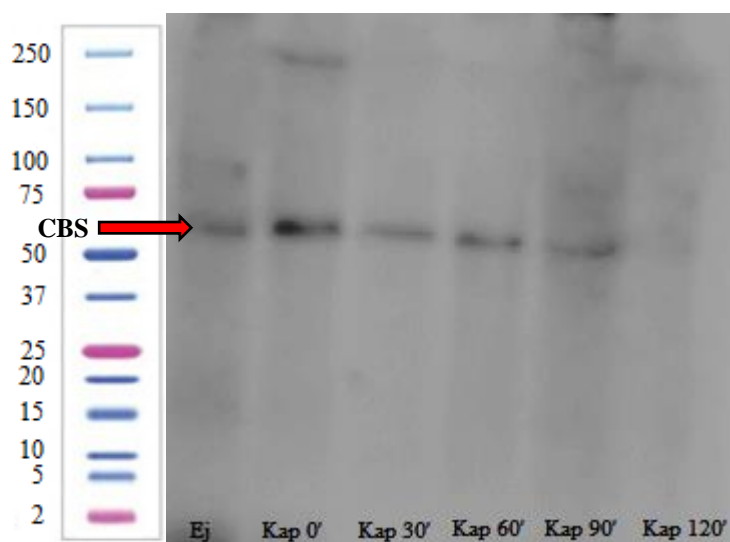
5 Výsledky

Imunofluorescenční metodou byla ve spermiích prokázána přítomnost všech sulfan produkujících enzymů a jejich lokalizace ve spermiích. Všechny enzymy se nacházely jak v hlavičce, tak v bičíku spermie. Průměrná intenzita signálu jednotlivých enzymů byla zhodnocena analýzou obrazu, následně byla vyjádřena relativně a byla vztažena k průměrné intenzitě signálu ejakulovaných spermií. Ve výsledcích není uvedena skupina spermií s kapacitačním médiem s dobou kapacitace 0 minut. Tato skupina byla kontrolní a sloužila pro ověření, zda kapacitační médium neovlivnilo expresi enzymů.

Metoda Western blot byla využita jako kontrolní metoda k potvrzení, že se dané enzymy v extraktech spermií skutečně vyskytují. Pomocí této metody byly v ejakulovaných i v kapacitovaných spermiích detekovány všechny tři sulfan produkující enzymy. Ve výsledcích jsou uvedeny také vzorky extraktů spermií s kapacitačním médiem, které ale samotnou kapacitaci nepodstoupily (kapacitované 0 minut). Tato kontrolní skupina sloužila pro ověření, že kapacitační médium nijak neovlivnilo expresi enzymů.

Cystathionin- β -syntáza (CBS)

Imunodetekce primární protilátky proti proteinu CBS označila na membráně protein o molekulové hmotnosti 61 kDa, který odpovídá molekulové hmotnosti CBS (viz Obr. č. 16). Metodou Western blot byla tedy přítomnost CBS prokázána.



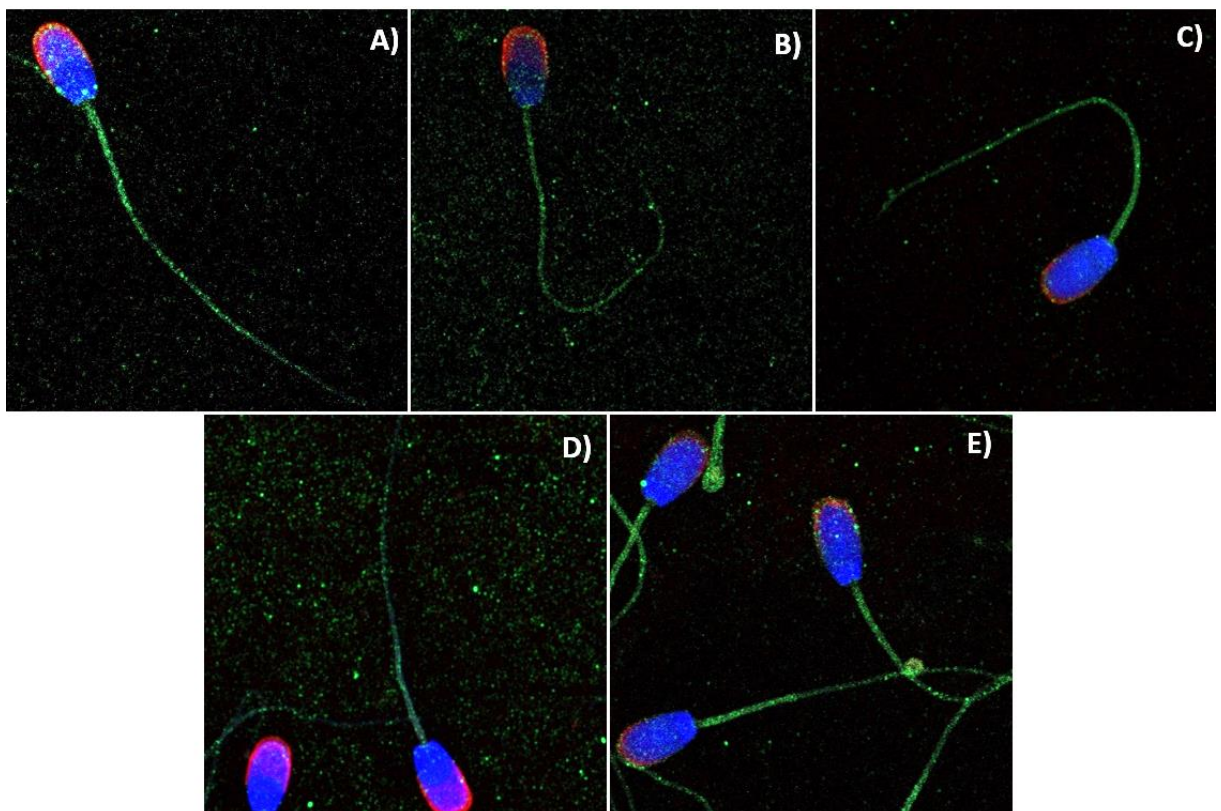
Obrázek č. 16 - Imunodetekce CBS v extraktech kančích spermií metodou Western blot.

Ej - ejakulované spermie, Kap 0' - spermie kapacitované 0 minut, Kap 30' - spermie kapacitované 30 minut, Kap 60' - spermie kapacitované 60 minut, Kap 90' - spermie kapacitované 90 minut, Kap 120' - spermie kapacitované 120 minut.

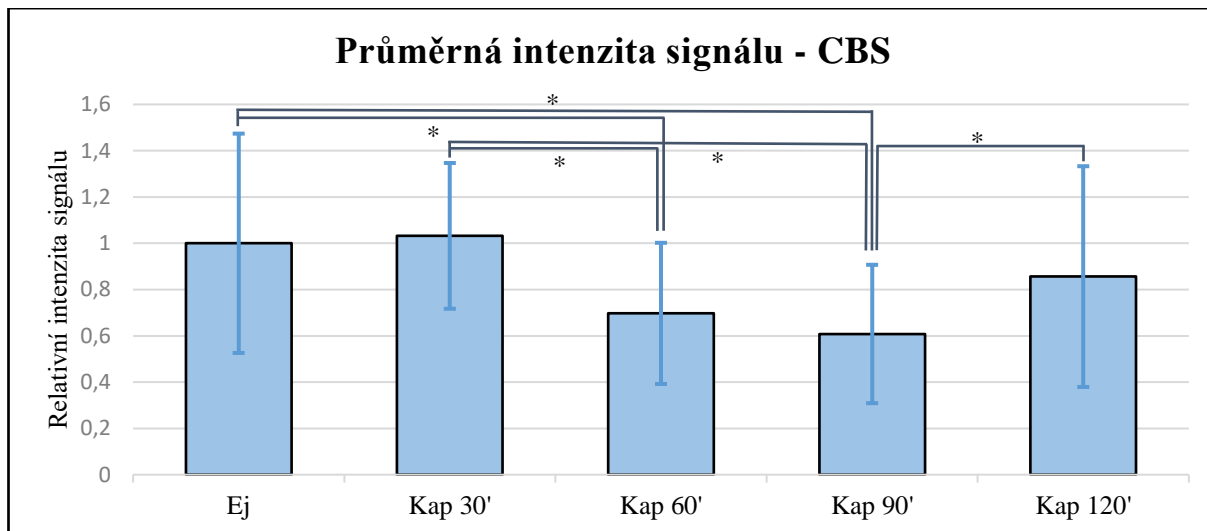
Imunofluorescencí byla prokázána přítomnost a rozložení CBS ve spermiích a pomocí analýzy obrazu změřena intenzita signálu enzymu. Signál CBS byl pozorován v celé spermii a vykazoval snižující se tendenci (viz Obr. č. 17). Nejvyšší průměrná intenzita byla pozorována u ejakulovaných spermií a spermií kapacitovaných 30 minut. Signifikantně nižší signál byl

naměřen u spermií kapacitovaných 60 minut. Signál spermií, jež byly kapacitovány 120 minut, byl signifikantně vyšší oproti spermiím kapacitovaných 90 minut. Jednotlivé rozdíly mezi skupinami vzorků jsou popsány na Obr. č. 18.

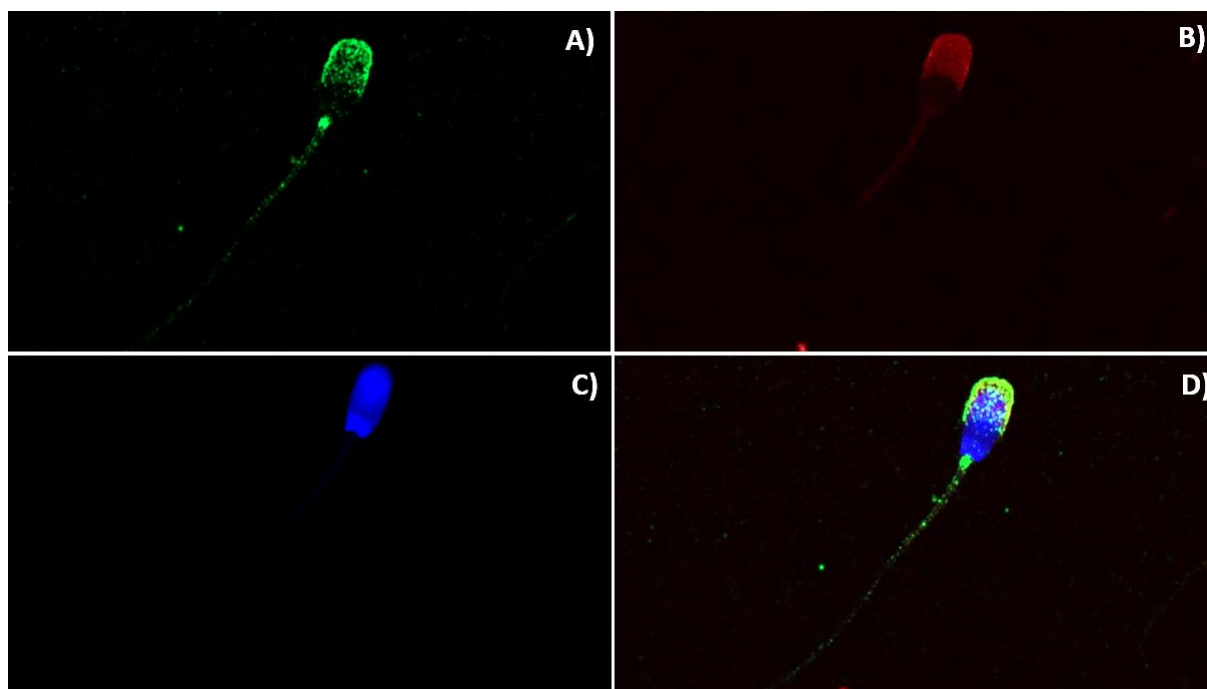
Signál CBS byl porovnáván v bičíku a v hlavičce spermie. Na rozdíl od dalších sulfan produkujících enzymů byl CBS zřetelně přítomen v akrozomu ejakulovaných spermií (viz Obr. č. 19). Z tohoto důvodu byla změřena průměrná intenzita signálu enzymu zvlášť v akrozomu a zvlášť v hlavičce spermie. Průměrná intenzita signálu CBS v akrozomu byla po statistické analýze vyhodnocena jako signifikantně vyšší než v hlavičce spermie (viz Obr. č. 20).



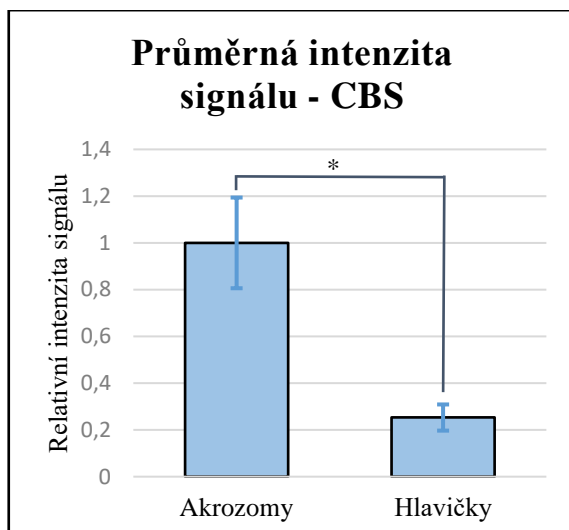
Obrázek č. 17 - Intenzita signálu CBS v kančích spermiích. Jádru označeno DAPI (modře), akrozom PNA-Rhodaminem (červeně) a protein CBS Alexa fluorem 488 (zeleně). A) ejakulované, B) kapacitované 30 minut, C) kapacitované 60 minut, D) kapacitované 90 minut, E) kapacitované 120 minut. Snímáno konfokálním mikroskopem, zvětšení 630x.



Obrázek č. 18 - Relativně vyjádřená průměrná intenzita signálu CBS v kančích spermích. Ej - ejakulované, Kap 30' - kapacitované 30 minut, Kap 60' - kapacitované 60 minut, Kap 90' - kapacitované 90 minut, Kap 120' - kapacitované 120 minut. Statisticky významný rozdíl vyznačen hvězdičkami (*).



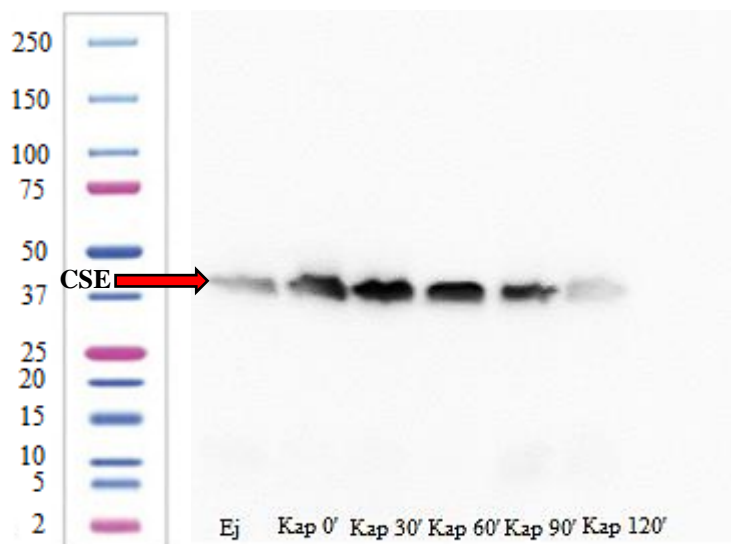
Obrázek č. 19 - Intenzita signálu CBS v kančích ejakulovaných spermích. A) CBS označen Alexa fluorem 488 (zeleně), B) akrozom označený PNA-Rhodaminem (červeně), C) jádro označené DAPI (modře), D) složený obraz. Snímáno konfokálním mikroskopem, zvětšení 630x.



Obrázek č. 20 - Relativně vyjádřená průměrná intenzita signálu CBS v akrozomech a hlavičkách kančích ejakulovaných spermií. Statisticky významný rozdíl vyznačen hvězdičkou (*).

Cystathionin- γ -lyáza (CSE)

Pomocí imunodetekce byla na membráně znázorněna také reakce primární protilátky proti proteinu CSE s proteinem o molekulové hmotnosti 44 kDa. Tento protein odpovídá svojí molekulovou hmotností enzymu CSE (viz Obr. č. 21). Tímto byla prokázána přítomnost CSE v extraktech spermií.

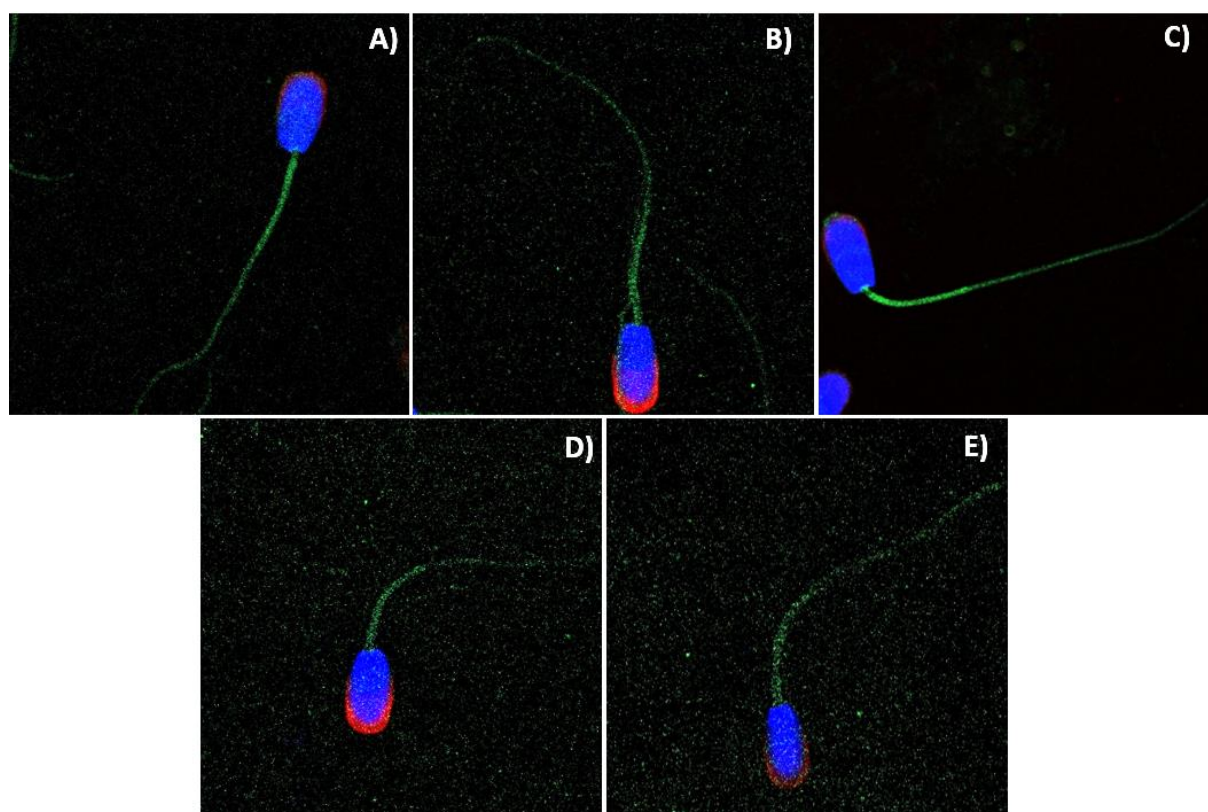


Obrázek č. 21 - Imunodetekce CSE v extraktech kančích spermií metodou Western blot. Ej - ejakulované spermie, Kap 0' - spermie kapacitované 0 minut, Kap 30' - spermie kapacitované 30 minut, Kap 60' - spermie kapacitované 60 minut, Kap 90' - spermie kapacitované 90 minut, Kap 120' - spermie kapacitované 120 minut.

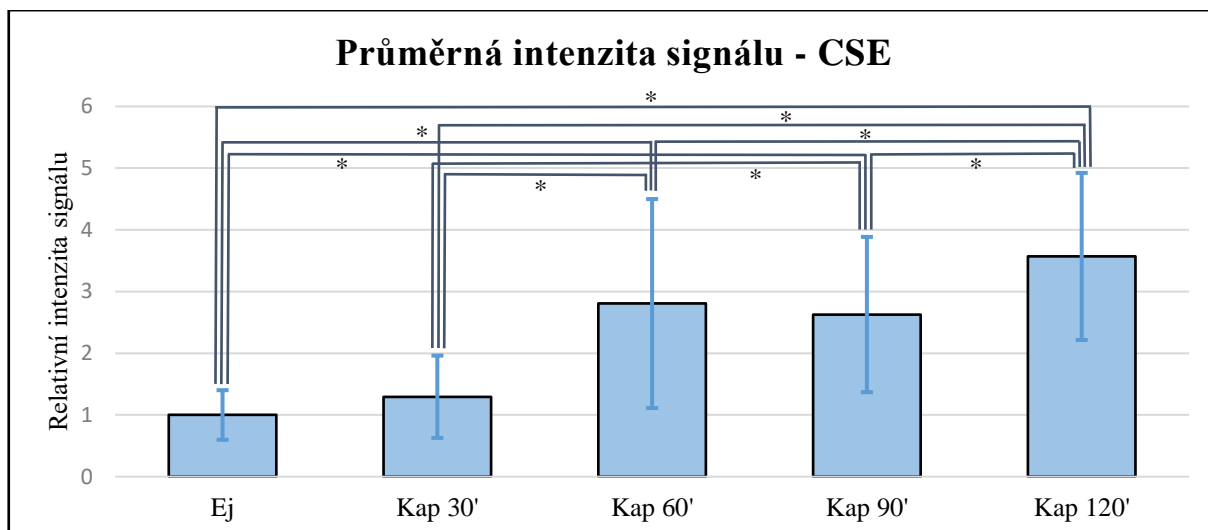
Imunofluorescencí byla potvrzena přítomnost CSE jak v hlavičce, tak v bičíku spermie (viz Obr. č. 22). Průměrná intenzita signálu byla změřena a na rozdíl od CBS vykazovala zvyšující se tendenci. Nejnižší průměrná intenzita byla detekována v ejakulovaných spermiích

a zvyšovala se s prodlužující se dobou kapacitace. Rozdíl mezi ejakulovanými spermii a spermii kapacitovanými 30 minut nebyl signifikantní. Také rozdíl mezi skupinou spermii kapacitovaných 60 a 90 minut nebyl statisticky významný. Mezi ostatními porovnávanými skupinami však byla statistická významnost prokázána. Signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami jsou znázorněny na Obr. č. 23.

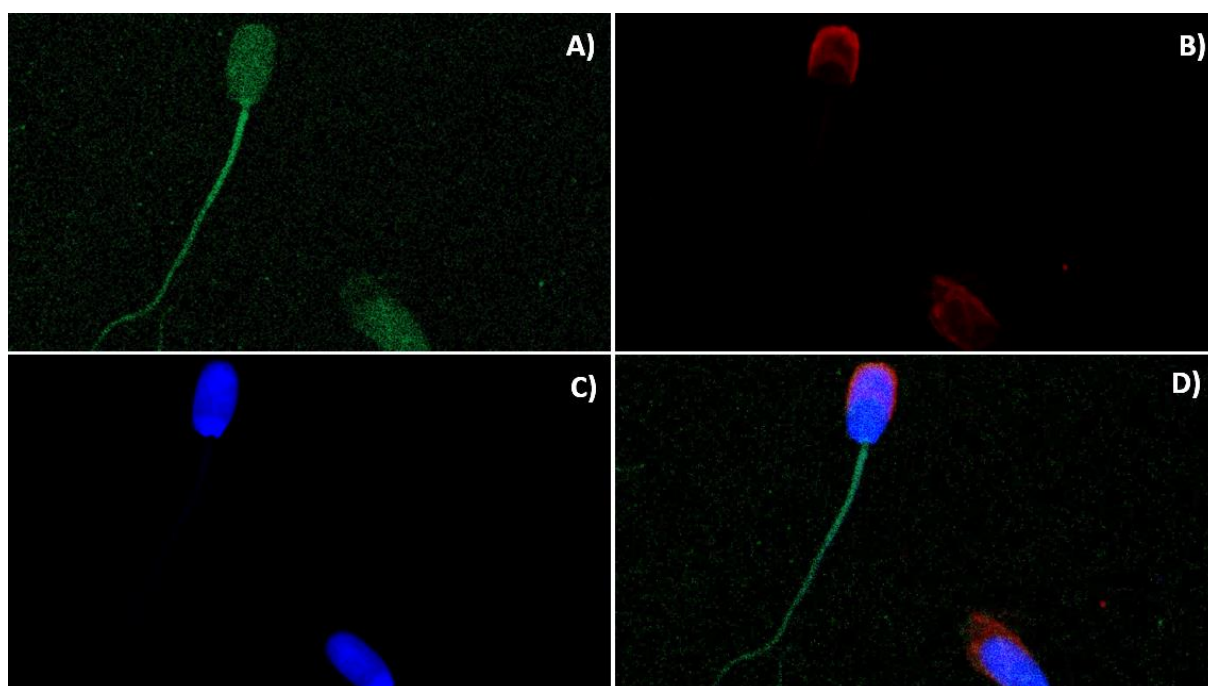
Také u CSE byla změřena průměrná intenzita signálu zvláště v akrozomu a v hlavičce ejakulovaných spermii. Přestože se enzym vyskytoval po celé délce spermie, v akrozomu vykazoval opačnou tendenci než u CBS (viz Obr. č. 24). Po statistické analýze byla průměrná intenzita signálu CSE vyhodnocena jako signifikantně nižší v akrozomu než v hlavičce (viz Obr. č. 25).



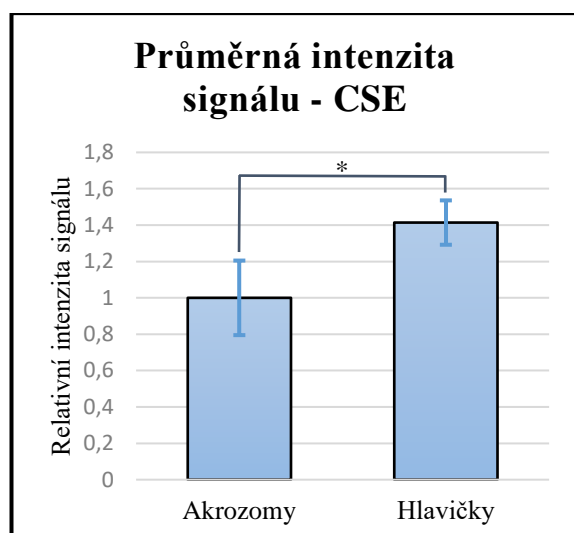
Obrázek č. 22 - Intenzita signálu CSE v kančích spermii. Jádru označeno DAPI (modře), akrozom PNA-Rhodaminem (červeně) a protein CSE Alexa fluorem 488 (zeleně). A) ejakulované, B) kapacitované 30 minut, C) kapacitované 60 minut, D) kapacitované 90 minut, E) kapacitované 120 minut. Snímáno konfokálním mikroskopem, zvětšení 630x.



Obrázek č. 23 - Relativně vyjádřená průměrná intenzita signálu CSE v kančích spermích. Ej - ejakulované, Kap 30' - kapacitované 30 minut, Kap 60' - kapacitované 60 minut, Kap 90' - kapacitované 90 minut, Kap 120' - kapacitované 120 minut. Statisticky významný rozdíl vyznačen hvězdičkami (*).



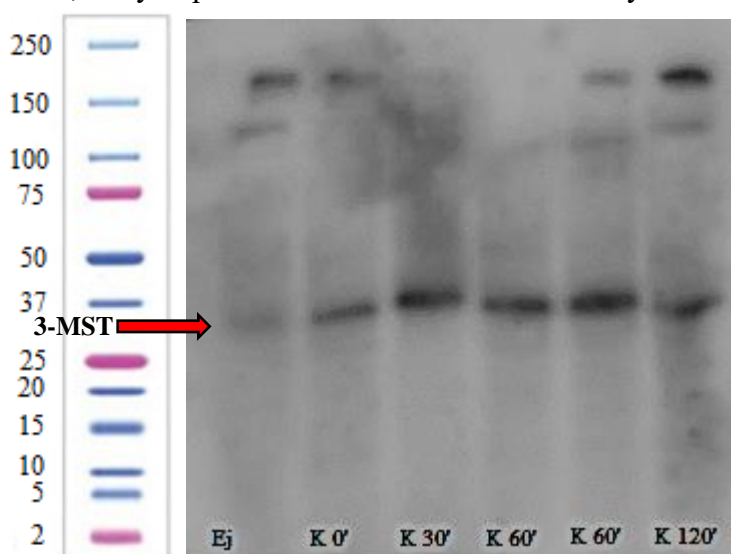
Obrázek č. 24 - Intenzita signálu CSE v kančích ejakulovaných spermích. A) CSE označen Alexa fluorem 488 (zeleně), B) akrozom označený PNA-Rhodaminem (červeně), C) jádro označené DAPI (modře), D) složený obraz. Snímáno konfokálním mikroskopem, zvětšení 630x.



Obrázek č. 25 - Relativně vyjádřená průměrná intenzita signálu CSE v akrozomech a hlavičkách kančích ejakulovaných spermií. Statisticky významný rozdíl vyznačen hvězdičkou (*).

3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (3-MST)

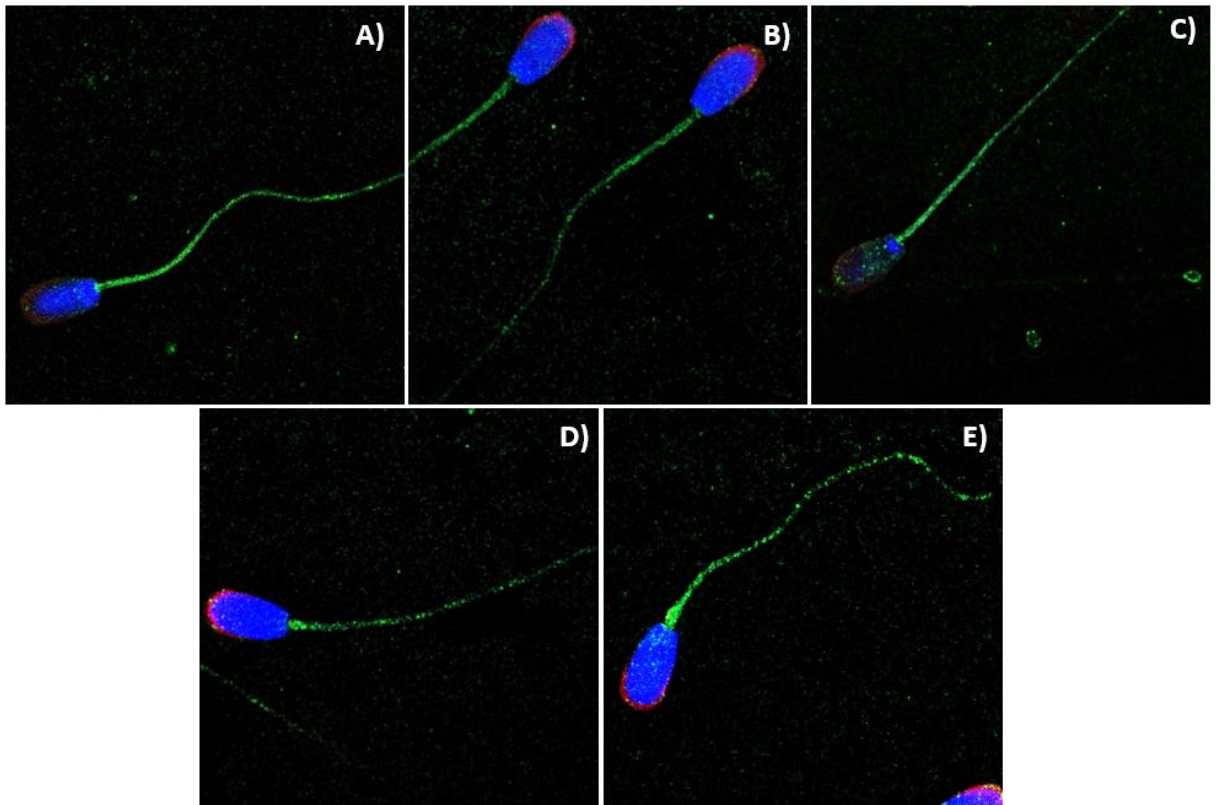
Metodou Western blot byla taktéž prokázána přítomnost proteinu o molekulové velikosti 33 kDa, který odpovídá molekulové hmotnosti enzymu 3-MST (viz Obr. č. 26).



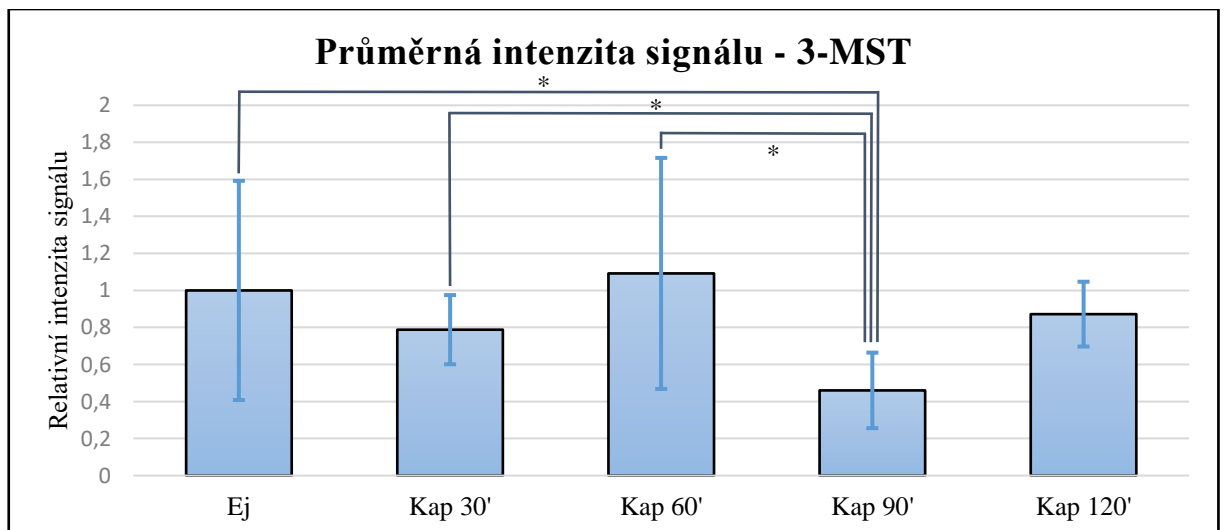
Obrázek č. 26 - Imunodetekce 3-MST v extraktech kančích spermií metodou Western blot. Ej - ejakulované spermie, K 0' - spermie kapacitované 0 minut, K 30' - spermie kapacitované 30 minut, K 60' - spermie kapacitované 60 minut, K 90' - spermie kapacitované 90 minut, K 120' - spermie kapacitované 120 minut.

Stejně jako u CBS a CSE, i 3-MST byl pomocí imunofluorescence detekován v hlavičce a v bičíku spermií (viz Obr. č. 27). Rozdíly v průměrné intenzitě signálu však nebyly tak výrazné jako u dvou výše zmíněných enzymů. Signifikantně významný rozdíl byl prokázán mezi skupinou ejakulovaných spermií, spermii kapacitovanými 30 a 60 minut a mezi spermii, jež prošly kapacitací 90 minut (viz Obr. č. 28). Intenzita signálu 3-MST byla stejně jako u CBS a CSE pozorována v akrozomu a hlavičce ejakulovaných spermií (viz Obr. 29).

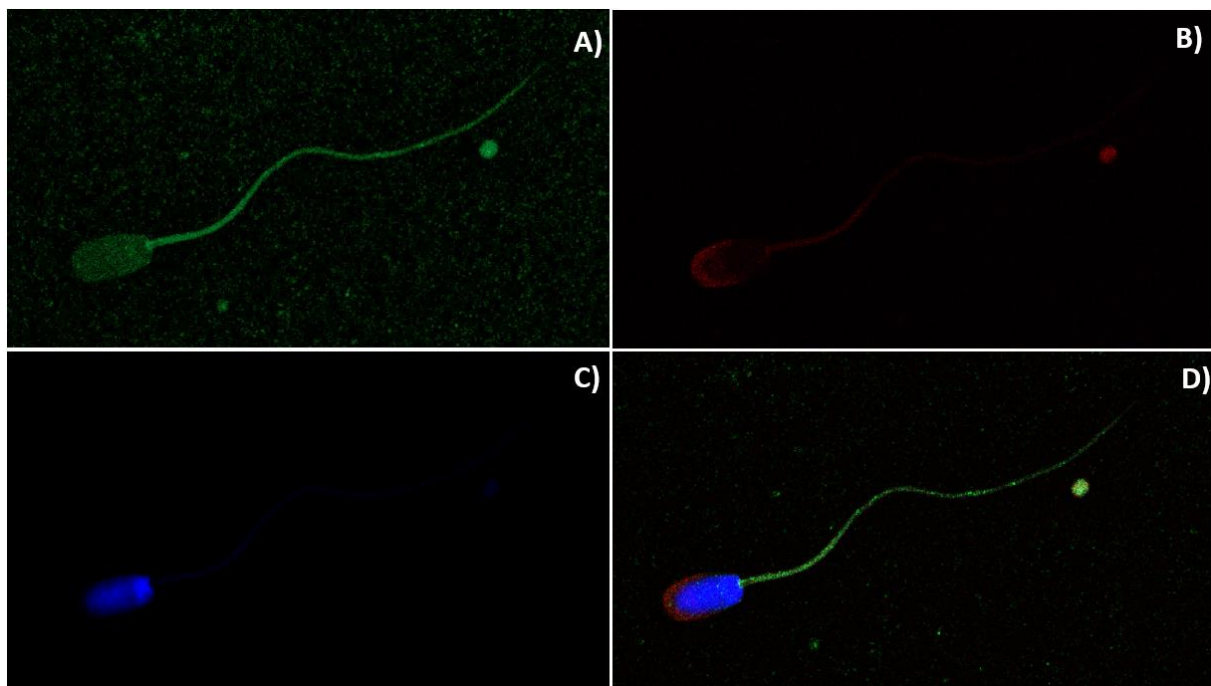
Po statistické analýze byla průměrná intenzita signálu akrozomu vyhodnocena jako signifikantně nižší než průměrná intenzita signálu hlavičky (viz Obr. č. 30).



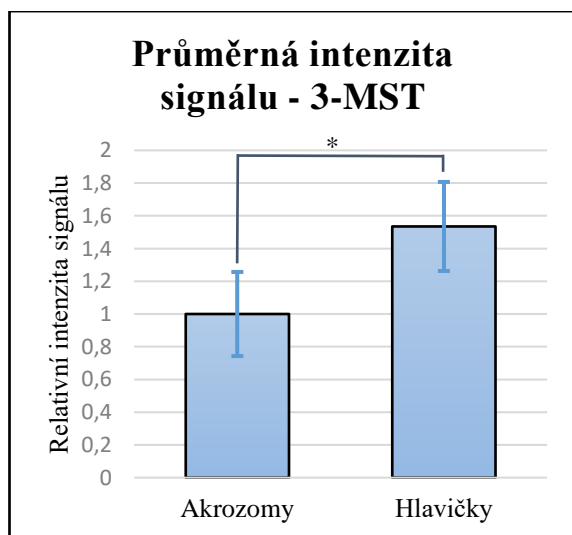
Obrázek č. 27 - Intenzita signálu 3-MST v kančích spermíích. Jádru označeno DAPI (modře), akrozom PNA-Rhodaminem (červeně) a protein 3-MST Alexa fluorem 488 (zeleně). A) ejakulované, B) kapacitované 30 minut, C) kapacitované 60 minut, D) kapacitované 90 minut, E) kapacitované 120 minut. Snímáno konfokálním mikroskopem, zvětšení 630x.



Obrázek č. 28 - Relativně vyjádřená průměrná intenzita signálu 3-MST v kančích spermíích. Ej - ejakulované, Kap 30' - kapacitované 30 minut, Kap 60' - kapacitované 60 minut, Kap 90' - kapacitované 90 minut, Kap 120' - kapacitované 120 minut. Statisticky významný rozdíl vyznačen hvězdičkami (*).



Obrázek č. 29 - Intenzita signálu 3-MST v kančích ejakulovaných spermích. A) 3-MST označen Alexa fluorem 488 (zeleně), B) akrozom označený PNA-Rhodaminem (červeně), C) jádro označené DAPI (modře), D) složený obraz. Snímáno konfokálním mikroskopem, zvětšení 630x.



Obrázek č. 30 - Relativně vyjádřená průměrná intenzita signálu 3-MST v akrozomech a hlavičkách kančích ejakulovaných spermí. Statisticky významný rozdíl vyznačen hvězdičkou (*).

6 Diskuse

Tato diplomová práce byla zacílena na prokázání změny exprese sulfan produkujících enzymů CBS, CSE a 3-MST v kančích spermích v průběhu kapacitace. Bylo zjištěno, že se všechny tyto enzymy v kančích spermích vyskytují. Exprese enzymů zodpovědných za produkci sulfanu byla nalezena v celé řadě buněk napříč orgánovými soustavami, ve kterých je sulfan zapojen do řízení různých fyziologických procesů. Tyto enzymy můžeme nalézt v nervovém, kardiovaskulárním, dýchacím či gastrointestinálním systému (Whiteman et al. 2004; Łowicka & Bełtowski 2007; Yang 2020). Jejich přítomnost byla popsána také v samičím i samčím reprodukčním traktu. Zde zastává sulfan různé funkce. Bezpochyby nejzajímavějším zjištěním je, že sulfan napomáhá erekci penisu (Srilatha et al. 2006; Srilatha et al. 2009). Přítomnost sulfan produkujících enzymů byla také popsána v prasečích oocytech (Krejčová et al. 2015), ale studie zabývající se expresí těchto enzymů v kančích spermích ve vědecké literatuře stále chybí. Enzymy byly prozatím prokázány v Sertoliho a Leydigových buňkách a v nezralých zárodečných buňkách ve varleti potkanů (Oi et al. 2001). V roce 2018 byly sulfan produkující enzymy popsány také v lidských spermích (Wang et al. 2018). V rámci bakalářských a diplomových prací napsaných pod záštitou Katedry veterinárních disciplín České zemědělské univerzity v Praze byly v roce 2019 popsány tyto enzymy také v ejakulovaných a kapacitovaných kančích spermích získaných z inseminačních dávek (Pilsová 2019; Pilsová 2019; Zelinková 2019).

Výsledky experimentů prokázaly změnu exprese u CBS a CSE během kapacitace, nikoliv však u 3-MST. Exprese CBS se snižovala s prodlužující se dobou kapacitace, což koreluje s dřívějšími výsledky (Pilsová 2019; Pilsová 2019; Zelinková 2019). Naopak exprese CSE v kančích spermích se v průběhu kapacitace signifikantně zvyšovala, což se shoduje s výsledky s Teng et al. (2013), který popsal při probíhající kapacitaci myších spermíí zvyšující se množství sulfan produkujících enzymů. Přítomnost sulfan produkujících enzymů ve spermích kance a myši a jejich změna exprese poukazuje na to, že sulfan hraje roli při regulaci fyziologických procesů ve spermích.

Změna exprese 3-MST při probíhající kapacitaci nebyla prokázána. Jediný signifikantně významný rozdíl byl mezi skupinou ejakulovaných spermíí, spermii kapacitovanými 30 a 60 minut a mezi spermii, jež prošly kapacitací 90 minut. Exprese 3-MST u spermíí kapacitovaných 120 minut se zvýšila, nicméně tento rozdíl nebyl statisticky významný. Výsledky 3-MST jsou proto nejednoznačné a bylo by vhodné provést další experimenty, které by objasnily expresi tohoto enzymu v průběhu kapacitace.

Přesná lokalizace CBS ve spermích je zatím stále neznámá, proto je jistě zajímavým zjištěním, že exprese CBS v akrozomu ejakulovaných kančích spermíí byla signifikantně vyšší než v samotné hlavičce spermíí. To by znamenalo, že se enzym nachází především na akrozomové membráně spermie a že je v průběhu kapacitace odbouráván. Jelikož se do degradace proteinů v průběhu kapacitace zapojuje ubikvitin proteasomový systém (Sutovsky et al. 2001), bylo by jistě zajímavé zjistit, zda je tomu tak i v případě CBS, či zda se do degradace tohoto proteinu zapojuje jiný mechanismus. Tyto výsledky poukazují na to, že sulfan hraje roli i při regulaci kapacitace kančích spermíí. Pokud jde o CSE a 3-MST, intenzita signálu v akrozomu byla naopak signifikantně nižší v akrozomu než v hlavičce.

Všechny dokazované sulfan produkující enzymy byly přítomné především v bičíku kančích spermii, což naznačuje, že by sulfan mohl hrát nějakou roli při regulaci motility spermie. Zhao et al. (2016) prokázal, že Na_2S (donor H_2S) snižoval aktivitu ATPázy a zvyšoval AMP-aktivovanou protein kinázu (AMPK), což vedlo ke snížení motility spermii. Také Wang et al. (2018) potvrdil, že při použití NaHS dochází ke snížení pohyblivosti spermii u asthenospermických pacientů. Sulfan ke svému účinku navíc využívá draselné kanály, které ovlivňují tvorbu ATP v mitochondriích a tím i motilitu spermie (Gupta et al. 2018). Proto je možné předpokládat, že sulfan skrz různé signální dráhy snižuje motilitu spermie. Expres CBS v kančích spermii se v průběhu kapacitace signifikantně snižovala, což by znamenalo, že motilita spermii by se s prodlužující dobou kapacitace zvyšovala. Vzhledem k tomu, že po proběhlé kapacitaci dochází k hyperaktivaci spermie a že CBS je jediný sulfan produkující enzym, u něhož byla pozorován signifikantně snižující se exprese v průběhu kapacitace, je možné, že právě CBS je hlavním sulfan produkujícím enzymem v kančích spermii. Na základě těchto zjištění by bylo možné další výzkum zacílit například na detekci motility spermii s inhibovaným CBS. Nicméně jak již bylo zmíněno, změna exprese během kapacitace byla pozorována také u CSE, proto by bylo vhodné objasnit roli v procesu kapacitace také tohoto enzymu. Dalším možným polem výzkumu, co se týká sulfan produkujících enzymů v reprodukci, by mohlo být například objasnění, zda sulfan hraje nějakou roli při akrozomové reakci či při samotném procesu oplození.

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo kromě shrnutí současných poznatků o sulfanu a sulfan produkujících enzimech se zaměřením na reprodukční systém také ověření hypotézy, že se exprese sulfan produkujících enzymů mění v průběhu kapacitace kančích spermií. K potvrzení této hypotézy byla využita imonucytochemická metoda a imunodetekce enzymů v extraktech spermií pomocí metody Western blot. Exprese cystathionin- β -syntázy se s prodlužující délkou kapacitace snižovala. Prostřednictvím imunofluorescence byl také prokázán rozdíl exprese CBS v akrozomu a v hlavičce ejakulovaných spermií, přičemž průměrná intenzita signálu v akrozomech byla signifikantně vyšší než v hlavičkách. Také exprese cystathionin- γ -lyázy se v průběhu kapacitace měnila, průměrná intenzita signálu však měla oproti CBS vzestupnou tendenci s prodlužující se dobou kapacitace. Exprese 3-MST byla v kančích spermiích detekována, nicméně nebylo jednoznačně prokázáno, že by se exprese tohoto enzymu v průběhu kapacitace výrazně měnila.

Vzhledem k získaným výsledkům je pravděpodobné, že sulfan produkující enzymy se zapojují do procesu kapacitace. Pro objasnění funkce těchto enzymů v regulaci průběhu kapacitace by bylo vhodné provést další experimenty se zaměřením na konkretizaci funkce enzymů v průběhu kapacitace, a to například inhibicí jednotlivých enzymů či zjištěním role ubikvitin proteasomového systému v degradaci těchto enzymů.

8 Literatura

- Abe K, Kimura H. 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of Neuroscience* **16**:1066 - 1071.
- Ali SE, Farag MA, Holvoet P, Hanafi RS, Gad MZ. 2016. A comparative metabolomics approach reveals early biomarkers for metabolic response to acute myocardial infarction. *Scientific Reports* **6**:2060–2071.
- Arp J, Childress J, Vetter R. 1987. The sulphide-binding protein in the blood of the vestimentiferan tube-worm, *Riftia pachyptila*, is the extracellular haemoglobin. *Journal of Experimental Biology* **128**:139 - 158.
- Baccetti B. 1984. The human spermatozoon. Pages 110-126 in Blerkom JV, Motta PM, editors. *Ultrastructure of reproduction* edition. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague.
- Bazhanov N, Escaffre O, Freiberg A, Garofalo R, Casola A. 2017. Broad-range antiviral activity of hydrogen sulfide against highly pathogenic RNA viruses. *Scientific Reports* **7**.
- Bearer E, Friend D. 1990. Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. *Journal of Electron Microscopy Technique* **16**:281-297.
- Bedford J, Calvin H. 1974a. Changes in -S-S- linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observations in sub-mammalian species. *Journal of Experimental Zoology* **187**:181-203.
- Bedford J, Calvin H. 1974b. The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *Journal of Experimental Zoology* **188**:137-155.
- Belardinelli M, Chabli A, Kamoun P. 2001. Urinary sulfur compounds in down syndrome. *Clinical Chemistry* **47**:1500 - 1501.
- Belleannée C. 2015. Extracellular microRNAs from the epididymis as potential mediators of cell-to-cell communication. *Asian Journal of Andrology* **17**:730-736.
- Berg A, Redeen S, Ericson A, Sjöstrand S. 2004. Nitric oxide-an endogenous inhibitor of gastric acid secretion in isolated human gastric glands. *BMC Gastroenterology* **4**.
- Bettegowda A, Wilkinson MF. 2010. Transcription and post-transcriptional regulation of spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**:1637-1651.
- Beyler S, Zaneveld L. 1982. Inhibition of in-vitro fertilization of mouse gametes by proteinase inhibitors. *Journal of reproduction and fertility* **66**:425-431.
- Bhatia M. 2009. Hydrogen sulfide and Substance P in inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**:1191 - 1202.

- Bhatia M, Wong F, Fu D, Lau H, Mochhala S, Moore P. 2005. Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. *The FASEB Journal* **19**:1-17.
- Bian J, Yong Q, Pan T, Feng Z, Ali M, Zhou S, Moore P. 2006. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **316**:670 - 678.
- Boerke A, Brouwers J, Olkkonen V, van de Lest C, Sostaric E, Schoevers E, Helms J, Gadella B. 2013. Involvement of bicarbonate-induced radical signaling in oxysterol formation and sterol depletion of capacitating mammalian sperm during in vitro fertilization. *Biology of Reproduction* **88**:8-21.
- Bryan J, Unnithan R. 1972. Non-specific esterase activity in bovine acrosomes. *The Histochemical Journal* **4**:413-419.
- Caballero I, Vazquez J, García E, Parrilla I, Roca J, Calvete J, Sanz L, Martínez E. 2008. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology* **70**:1352-1355.
- Calvete J et al. 1997. Monoclonal antibodies against boar sperm zona pellucida-binding protein AWN-1. Characterization of a continuous antigenic determinant and immunolocalization of AWN epitopes in inseminated sows. *Biology of Reproduction* **57**:735-742.
- Cavallini D, Mondovi B, de Marco C, Scioscia-Santoro A. 1962. The mechanism of desulphhydration of cysteine. *Enzymologia* **24**:253-266.
- Cosman M et al. 1999. Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm. Pages 55-70 in Cagnon C, editor. *The male gamete: from basic knowledge to clinical applications*. Cache River Press, Vienna, Illinois.
- Cummings B. 2004. Pearson Education, Inc. Available from www.pearson.com (accessed February 2021).
- Czaker R. 1985. Morphogenesis and cytochemistry of the postacrosomal dense lamina during mouse spermiogenesis. *Journal of Ultrastructure Research* **90**:26-39.
- de Lourdes Juárez-Mosqueda M, Mújica A. 1999. A perinuclear theca substructure is formed during epididymal guinea pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *Journal of Structural Biology* **128**:225-236.
- de Rooij DG. 2017. The nature and dynamics of spermatogonial stem cells. *Development* **144**:3022-3030.
- Dello Russo C, Tringali G, Ragazzoni E, Maggiano N, Menini E, Vairano M, Preziosi P, Navarra P. 2000. Evidence that hydrogen sulphide can modulate hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: in vitro and in vivo studies in the rat. *Journal of Neuroendocrinology* **12**:225-233.

- 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.
- Diao R et al. 2014. Deficient human β -defensin 1 underlies male infertility associated with poor sperm motility and genital tract infection. *Science Translational Medicine* **6**:249 - 108.
- Distrutti E et al. 2006. 5-amino-2-hydroxybenzoic acid 4-(5-thioxo-5H-[1,2]dithiol-3yl)-phenyl ester (ATB-429), a hydrogen sulfide-releasing derivative of mesalamine, exerts antinociceptive effects in a model of postinflammatory hypersensitivity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **319**:447-458.
- Doeller J, Isbell T, Benavides G, Koenitzer J, Patel H, Patel R, Lancaster J. 2005. Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Analytical Biochemistry* **341**:40 - 51.
- Eddy E, O'Brien D. 1994. The Spermatozoon. Pages 29 - 77 in Neill JD, Knobil E, editors. *Physiology of Reproduction* edition. Academic Press, Cambridge.
- Ekhlas-Hundrieser M, Schäfer B, Kirchhoff C, Hess O, Bellair S, Müller P, Töpfer-Petersen E. 2005. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Molecular Reproduction and Development* **70**:45-57.
- 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.
- Erickson R, Martin S. 1974. The relationship of mouse spermatozoal to mouse testicular cathepsins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **165**:114-120.
- Eto K, Asada T, Arima K, Makifuchi T, Kimura H. 2002. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **293**:1485-1488.
- Evans J, Hardy D, Storey B. 2001. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Fawcett D. 1970. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biology of Reproduction* **2**:90-127.
- Feng S, Chen S, Yu W, Zhang D, Zhang C, Tang C, Du J, Jin H. 2017. H₂S inhibits pulmonary arterial endothelial cell inflammation in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Laboratory Investigation* **97**:268-278.
- Fiorucci S, Antonelli E, Mencarelli A, Orlandi S, Renga B, Rizzo G, Distrutti E, Shah V, Morelli A. 2005. The third gas: H₂S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis. *Hepatology* **42**:539-548.

- Florman H, Jungnickel M, Sutton K. 2008. Regulating the acrosome reaction. *The International Journal of Developmental Biology* **52**:503 - 510.
- Foster J. 2018. Reproduction and Development. Page in SlidePlayer edition. Available from <https://slideplayer.com/slide/12849322/> (accessed 2020-09-27).
- Frenette G, Sullivan R. 2001. Prostatome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Molecular Reproduction and Development* **vol. 59**:115-121.
- Furukawa K, Hotta Y. 1993. cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *The EMBO Journal* **12**:97-106.
- Gadella B, van Gestel R. 2004. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Animal Reproduction Science* **82-83**:307-319.
- Gai J, Wahafu W, Guo H, Liu M, Wang X, Xiao Y, Zhang L, Xin Z, 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.
- Galantino-Homer HL, Florman HM, Storey BT, Dobrinski I, Kopf GS. 2004. Bovine sperm capacitation: assessment of phosphodiesterase activity and intracellular alkalinization on capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation. *Molecular Reproduction and Development* **67**:487-500.
- Gangwar D, Atreja S. 2015. Signalling events and associated pathways related to the mammalian sperm capacitation. *Reproduction in Domestic Animals* **50**:705-711.
- García-Bereguaín M, Samhan-Arias A, Martín-Romero F, Gutiérrez-Merino C. 2008. Hydrogen sulfide raises cytosolic calcium in neurons through activation of L-type Ca²⁺ channels. *Antioxidants & Redox Signaling* **10**:31-42.
- García E, Vázquez J, Calvete J, Sanz I, Caballero I, Parrilla I, Gil M, Roca J, Martínez E. 2006. Dissecting the protective effect of the seminal plasma spermadhesin PSP-I/PSP-II on boar sperm functionality. *Journal of Andrology* **27**:434-443.
- García-Tevijano E, Berasain C, Rodríguez J, Corrales F, Arias R, Martín-Duce A, Caballería J, Mato J, Avila M. 2001. Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis. *Hypertension* **38**:1217-1221.
- Garner D, Easton M. 1977. Immunofluorescent localization of acrosin in mammalian spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology* **200**:157-162.
- Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C. 2004. 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. 2004. H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**:362 - 368.
- Gervasi M, Visconti P. 2017. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology* **5**:204-218.
- Givvimani S, Munjal C, Gargoum R, Sen U, Tyagi N, Vacek J, Tyagi S. 2011. Hydrogen sulfide mitigates transition from compensatory hypertrophy to heart failure. *Journal of Applied Physiology* **110**:1093-1100.
- Glickman M, Ciechanover A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews* **82**:373-428.
- Gonzales L, Meizel S. 1973. Acid phosphatases of rabbit spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **320**:180-194.
- Green D, Hockaday A. 1978. The histochemical localization of acrosin in guinea-pig sperm after the acrosome reaction. *Journal of Cell Science* **32**:177-184.
- Greube A, Müller K, Töpfer-Petersen E, Herrmann A, Müller P. 2004. Interaction of fibronectin type II proteins with membranes: the stallion seminal plasma protein SP-1/2. *Biochemistry* **43**:464-472.
- Guan R et al. 2020. Hydrogen sulfide inhibits cigarette smoke-induced inflammation and injury in alveolar epithelial cells by suppressing PHD2/HIF-1 α /MAPK signaling pathway. *International Immunopharmacology* **81**.
- Guo C, Liang F, Shah Masood W, Yan X. 2014. Hydrogen sulfide protected gastric epithelial cell from ischemia/reperfusion injury by Keap1 s-sulfhydration, MAPK dependent anti-apoptosis and NF- κ B dependent anti-inflammation pathway. *European Journal of Pharmacology* **725**:70-78.
- 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.
- Gupta RK, Swain DK, Singh V, Anand M, Choudhury S, Yadav S, Saxena A, Garg SK. 2018. Molecular characterization of voltage-gated potassium channel (Kv) and its importance in functional dynamics in bull spermatozoa. *Theriogenology* **114**:229-236.
- Guzmán M et al. 2006. Cystathionine beta-synthase is essential for female reproductive function. *Human Molecular Genetics* **15**:3168 - 3176.
- Haraguchi C, Ishido K, Kominami E, Yokota S. 2003. Expression of cathepsin H in differentiating rat spermatids: immunoelectron microscopic study. *Histochemistry and Cell Biology* **120**:63-71.

- Hecht N. 1999. Protamine gene expression: a model for post-transcriptional gene regulation in male germ cells. Pages 5-10 in Cagnon C, editor. The male gamete: from basic knowledge to clinical applications. Cache River Press., Vienna, Illinois.
- Hess K et al. 2005. The “soluble” adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Developmental Cell* **9**:249-259.
- 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 S, Li H, Ge J. 2015. A cardioprotective insight of the cystathionine γ -lyase/hydrogen sulfide pathway. *International Journal of Cardiology. Heart & Vasculature* **7**:51 - 57.
- Huang X, Meng XM, Liu DH, Wu YS, Guo X, Lu HL, Zhuang XY, Kim YC, Xu WX. 2013. Different regulatory effects of hydrogen sulfide and nitric oxide on gastric motility in mice. *European Journal of Pharmacology* **720**:276-285.
- Huang Y, Cheng X, Jiang R. 2012. Hydrogen sulfide and penile erection. *National Journal of Andrology* **18**:823 - 826.
- Hui Y, Du J, Tang C, Bin G, Jiang H. 2003. Changes in arterial hydrogen sulfide (H₂S) content during septic shock and endotoxin shock in rats. *Journal of Infection* **47**:155-160.
- Hunnicutt G, Koppel D, Myles D. 1997. Analysis of the process of localization of fertilin to the sperm posterior head plasma membrane domain during sperm maturation in the epididymis. *Developmental Biology* **191**:146-159.
- Cheng Y, Ndisang J, Tang G, Cao K, Wang R. 2004. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **287**:2316-2323.
- 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.
- Chen Y, Yao W, Geng B, Ding Y, Lu M, Zhao M, Tang C. 2005. Endogenous hydrogen sulfide in patients with COPD. *Chest* **128**:3205-3211.
- Chen Y, Wang R. 2012. The message in the air: hydrogen sulfide metabolism in chronic respiratory diseases. *Respiratory Physiology & Neurobiology* **184**:130-138.
- Cheung N, Peng Z, Chen M, Moore P, Whiteman M. 2007. Hydrogen sulfide induced neuronal death occurs via glutamate receptor and is associated with calpain activation and lysosomal rupture in mouse primary cortical neurons. *Neuropharmacology* **53**:505-514.
- 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.

- Ise F, Takasuka H, Hayashi S, Takahashi K, Koyama M, Aihara E, Takeuchi K. 2011. Stimulation of duodenal HCO₃⁻ secretion by hydrogen sulphide in rats: relation to prostaglandins, nitric oxide and sensory neurones. *Acta Physiologica* **201**:117-126.
- 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.
- Jagan Mohanarao G, Atreja S. 2012. Identification of NO induced and capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Research in Veterinary Science* **93**:618-623.
- Jiang L, Jiang Q, Yang S, Huang S, Han X, Duan J, Pan S, Zhao M, Guo S. 2019. GYY4137 attenuates LPS-induced acute lung injury via heme oxygenase-1 modulation. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **54**:77-86.
- Jin H, Du J, Tang C. 2010. "Waste gas is not waste": advance in the research of hydrogen sulfide. *Sheng Li Xue Bao* **62**:495-04.
- Jones R. 1989. Membrane remodelling during sperm maturation in the epididymis. *Oxford Reviews of Reproductive Biology* **11**:285 - 337.
- Jones R. 2002. Plasma membrane composition and organisation during maturation of spermatozoa in the epididymis. Pages 405-416 in Robaire B, Hinton BT, editors. *The epididymis: from molecules to clinical practice*. Springer US, Boston, MA.
- Joshi C, Suryawanshi A, Khan S, Balasinor N, Khole V. 2013. Liprin α 3: a putative estrogen regulated acrosomal protein. *Histochemistry and Cell Biology* **139**:535-548.
- Julian D, Statile J, Wohlgemuth S, Arp A. 2002. Enzymatic hydrogen sulfide production in marine invertebrate tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **133**:105-115.
- Kamoun P, Belardinelli M, Chabli A, Lallouchi K, Chadeaux-Vekemans B. 2003. Endogenous hydrogen sulfide overproduction in Down syndrome. *American Journal of Medical Genetics* **116**:310-311.
- 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.
- Kann M, Feinberg J, Rainteau D, Dadoune J, Weinman S, Fouquet J. 1991. Localization of Calmodulin in perinuclear structures of spermatids and spermatozoa: A comparison of six mammalian species. *The Anatomical Record* **230**:481-488.

- Kimura H. 2010. Hydrogen sulfide: from brain to gut. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**:1111 - 1123.
- Kimura H. 2013. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. *Neurochemistry International* **63**:492 - 497.
- Kimura H, Shibuya N, Kimura Y. 2012. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant. *Antioxidants and Redox Signaling* **17**:45 - 57.
- 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.
- Kittnar O. 2011. *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing, Praha.
- Koehler J. 1978. The mammalian sperm surface: studies with specific labeling techniques. Pages 73-108 in Bourne GH, Danielli JF, editors. *International Review of Cytology*. Academic Press, New York.
- Koren E, Milkovic S. 1973. "Collagenase-like" peptidase in human, rat and bull spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility* **32**:349-356.
- Kram L, Grambow E, Mueller-Graf F, Sorg H, Vollmar B. 2013. The anti-thrombotic effect of hydrogen sulfide is partly mediated by an upregulation of nitric oxide synthases. *Thrombosis Research* **132**:112–117.
- Krapf D, Ruan Y, Wertheimer E, Battistone M, Pawlak J, Sanjay A, Pilder S, Cuasnicu P, Breton S, Visconti P. 2012. cSrc is necessary for epididymal development and is incorporated into sperm during epididymal transit. *Developmental Biology* **369**:43-53.
- Krejčová T et al. 2015. Hydrogen sulfide donor protects porcine oocytes against aging and improves the developmental potential of aged porcine oocytes. *Public Library of Science* **10**.
- Krohne G, Benavente R. 1986. The nuclear lamins. A multigene family of proteins in evolution and differentiation. *Experimental Cell Research* **162**:1-10.
- Leahy T, Gadella B. 2011. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction* **142**:759-778.
- 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 H et al. 2015. Role of hydrogen sulfide in paramyxovirus infections. *Journal of Virology* **89**:5557-5568.
- Li L, Bhatia M, Moore P. 2006. Hydrogen sulphide - a novel mediator of inflammation?. *Current Opinion in Pharmacology* **6**:125-129.
- Li L, Bhatia M, Zhu Y, Zhu Y, Ramnath R, Wang Z, Anuar F, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore P. 2005. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *The FASEB Journal* **19**:1196-1198.
- Li L, Rose P, Moore P. 2011. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **51**:169-187.
- 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.
- Lishko P, Botchkina I, Fedorenko A, Kirichok Y. 2010. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* **140**:327-337.
- Lishko P, Botchkina I, Kirichok Y. 2011. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* **471**:387-391.
- Liu Y, Lu M, Hu L, Wong P, Webb G, Bian J. 2012. Hydrogen sulfide in the mammalian cardiovascular system. *Antioxidants & Redox Signaling* **17**:141-185.
- Lowicka E, Beltowski J. 2007. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological Reports* **59**:4 - 24.
- Lukassen S et al. 2020. SARS -CoV-2 receptor ACE 2 and TMPRSS 2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *The EMBO Journal* **39**.
- Lu M, Choo C, Hu L, Tan B, Hu G, Bian J. 2010. Hydrogen sulfide regulates intracellular pH in rat primary cultured glia cells. *Neuroscience Research* **66**:92 - 98.
- Lyons J et al. 2001. Cysteine metabolism and whole blood glutathione synthesis in septic pediatric patients. *Critical Care Medicine* **29**:870-877.
- Madurga A et al. 2015. The H₂S-generating enzymes cystathionine β-synthase and cystathionine γ-lyase play a role in vascular development during normal lung alveolarization. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **309**:710-724.
- 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.
- Majumder G, Turkington R. 1974. Acrosomal and lysosomal isoenzymes of β-galactosidase and N-acetyl- β-glucosaminidase in rat testis. *Biochemistry* **13**:2857-2864.

- Mani S, Untereiner A, Wu L, Wang R. 2014. Hydrogen sulfide and the pathogenesis of atherosclerosis. *Antioxidants & Redox Signaling* **20**:805-817.
- Mard S, Askari H, Neisi N, Veisi A. 2014. Antisecretory effect of hydrogen sulfide on gastric acid secretion and the involvement of nitric oxide. *BioMed Research International* **2014**:1-7.
- Marques-da-Silva D, Samgan-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.
- Medeiros J et al. 2012. Role of KATP channels and TRPV1 receptors in hydrogen sulfide-enhanced gastric emptying of liquid in awake mice. *European Journal of Pharmacology* **693**:57-63.
- Meistrich ML, van Beek MEAB. 1993. Spermatogonial stem cells. Pages 266-295 in Desjardins C, Ewing LL, editors. *Cell and molecular biology of the testis*. Oxford University Press, London.
- Meizel S. 1984. The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. *Biological Reviews* **59**:125-157.
- Meizel S, Cotham J. 1972. Partial characterization of a new bull sperm arylamidase. *Journal of reproduction and fertility* **28**:303-307.
- Meng Q, Yang G, Yang W, Jiang B, Wu L, Wang R. 2007. Protective effect of hydrogen sulfide on balloon injury-induced neointima hyperplasia in rat carotid arteries. *The American Journal of Pathology* **170**:1406-1414.
- Mitchell T, Savage J, Gould D. 1993. High-performance liquid chromatography detection of sulfide in tissues from sulfide-treated mice. *Journal of Applied Toxicology* **13**:389 - 394.
- Mitsushashi 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.
- Mok Y, Mohammed Atan M, Ping C, Jing W, Bhatia M, Mochhala S, Moore P. 2004. Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis. *British Journal of Pharmacology* **143**:881-889.
- Mo S, Hua Y. 2018. Cystathionine gamma lyase-H₂S contributes to osteoclastogenesis during bone remodeling induced by mechanical loading. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **501**:471 - 477.
- Murta D, Batista M, Silva E, Trindade A, Henrique D, Duarte A, Lopes-da-Costa L. 2016. Notch signaling in the epididymal epithelium regulates sperm motility and is transferred at a distance within epididymosomes. *Andrology* **4**:314-327.

- Nagai Y, Tsugane M, Oka J, Kimura H. 2004. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *The FASEB Journal* **18**:557 - 559.
- O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. 2006. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radical Biology and Medicine* **41**:528-540.
- 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.
- 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.
- Olson G, Winfrey V. 1985. Substructure of a cytoskeletal complex associated with the hamster sperm acrosome. *Journal of Ultrastructure Research* **92**:167-179.
- Olukole S, Madekurozwa M, Oke B. 2018. Spermiogenesis in the African sideneck turtle (*Pelusios castaneus*): acrosomal vesicle formation and nuclear morphogenesis. *Journal of King Saud University - Science* **30**:359-366.
- Oura C. 1971. The ultrastructure and development of the neck region of the golden hamster spermatozoon. *Monitore Zoologico Italiano* **5**:253-264.
- Pan L, Liu X, Gong Q, Yang H, Zhu Y. 2012. Role of cystathionine γ -lyase/hydrogen sulfide pathway in cardiovascular disease: a novel therapeutic strategy?. *Antioxidants & Redox Signaling* **17**:106-118.
- Pan L, Qin M, Liu X, Zhu Y. 2017. The role of hydrogen sulfide on cardiovascular homeostasis: an overview with update on immunomodulation. *Frontiers in Pharmacology* **8**.
- 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.
- Perry M, Tildy B, Papi A, Casolari P, Caramori G, Rempel K, Halayko A, Adcock I, Chung K. 2018. The anti-proliferative and anti-inflammatory response of COPD airway smooth muscle cells to hydrogen sulfide. *Respiratory Research* **19**.
- Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. 2010. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**:1663-1678.
- Pilsová A. 2019. Sulfan produkující enzymy v kančích spermiích. [BSc. Thesis]. Czech University of Life Sciences Prague, Prague.
- Pilsová Z. 2019. Sulfan produkující enzymy v kančích spermiích. [BSc. Thesis]. Czech University of Life Sciences Prague, Prague.

- Pintus E, Jovičić M, Kadlec M, Ros-Santaella J. 2020. Divergent effect of fast- and slow-releasing H₂S donors on boar spermatozoa under oxidative stress. *Scientific Reports* **10**.
- Polakoski K, Parrish R. 1977. Purification and preliminary activation studies of proacrosin isolated from ejaculated boar sperm. *The Journal of Biological Chemistry* **252**:1888-1894.
- 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.
- Polhemus D, Lefer D. 2014. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. *Circulation Research* **114**:730 - 737.
- Predmore B, Lefer D. 2010. Development of hydrogen sulfide-based therapeutics for cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular Translational Research* **3**:487 - 498.
- Qu K, Chen C, Halliwell B, Moore P, Wong P. 2006. Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage. *Stroke*. **37**:889 - 893.
- Reiffenstein R, Hulbert W, Roth S. 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **32**:109-134.
- Ribbes H, Plantavid M, Bennet P, Chap H, Douste-Blazy L. 1987. Phospholipase C from human sperm specific for phosphoinositides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **919**:245-254.
- Roderick H, Berridge M, Bootman M. 2003. Calcium-induced calcium release. *Current Biology* **13**:425.
- Roy S, Atreja S. 2008. Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **107**:68-84.
- Russell L. 1984. Spermiation: the sperm release process: ultrastructural observations and unresolved problems. Pages 46-66 in Vlerkom JV, Motta PM, editors. *Ultrastructure of reproduction*. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague.
- Russell L, Ettlin R, Hikim A, Clegg E. 1993. Histological and histopathological evaluation of the testis. *International journal of andrology* **16**:83.
- Saez F, Ouvrier A, Drevet J. 2010. Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. *Asian Journal of Andrology* **13**:11-17.
- Santi C, Martínez-López P, de la Vega-Beltrán J, Butler A, Alisio A, Darszon A, Salkoff L. 2010. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Letters* **584**:1041-1046.
- Sharma U et al. 2016. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science* **351**:391-396.

- 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.
- Shukla N, Rossoni G, Hotston M, Sparatore A, Del Soldato P, Tazzari V, Persad R, Agelini G, Jeremy J. 2009. Effect of hydrogen sulphide-donating sildenafil (ACS6) on erectile function and oxidative stress in rabbit isolated corpus cavernosum and in hypertensive rats. *BJU International* **103**:1522 - 1529.
- Schollmeyer J. 1986. Identification of Calpain II in Porcine Sperm. *Biology of Reproduction* **34**:721-731.
- 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.
- 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.
- Srivastava A, Olson G. 1991. Glycoprotein changes in the rat sperm plasma membrane during maturation in the epididymis. *Molecular Reproduction and Development* **29**:357-364.
- Srivastava P, Abou-Issa H. 1977. Purification and properties of rabbit spermatozoal acrosomal neuraminidase. *Biochemical Journal* **161**:193-200.
- Stambaugh R, Buckley J. 1970. Comparative studies of the acrosomal enzymes of rabbit, rhesus monkey, and human spermatozoa. *Biology of Reproduction* **3**:275-282.
- Stipanuk M, Beck P. 1982. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphydration in liver and kidney of the rat. *Biochemical Journal* **206**:267 - 277.
- 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.
- 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.

- Sullivan R, Saez F. 2013. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction* **146**:21-35.
- Sutovsky P. 2011. Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction* **142**:1-14.
- Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson W, Schatten G. 2001. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *Journal of Cell Science* **114**:1665-1675.
- Sutton K, Jungnickel M, Wang Y, Cullen K, Lambert S, Florman H. 2004. Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm. *Developmental Biology* **274**:426-435.
- Szabó C. 2007. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery* **6**:917-935.
- Tang G, Wu L, Liang W, Wang R. 2005. Direct stimulation of K(ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology* **68**:1757 - 1764.
- Tanphaichitr N, Sobhon P, Taluppeth N, Chalermisarachai P. 1978. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Experimental Cell Research* **117**:347-356.
- Teclé E, Gagneux P. 2015. Sugar-coated sperm: unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Molecular Reproduction and Development* **82**:635-650.
- Teng H, Wu B, Zhao K, Yang G, Wu L, Wang R. 2013. Oxygen-sensitive mitochondrial accumulation of cystathionine β -synthase mediated by Lon protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**:12679 - 12684.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Animal Reproduction Science* **89**:159-170.
- 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.
- Wallace J, Dickey M, McKnight W, Martin G. 2007. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. *The FASEB Journal* **21**:4070-4076.
- Wandernoth P, Raubuch M, Mannowetz N, Becker H, Deitmer J, Sly W, Wennemuth G, Linden R. 2010. Role of carbonic anhydrase iv in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm. *PLoS ONE* **5**:15061.
- 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?. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **16**:1792 - 1798.
- Wang R. 2009. Hydrogen sulfide: a new EDRF. *Kidney International* **76**:700 - 704.
- Wang R. 2010. Hydrogen sulfide: the third gasotransmitter in biology and medicine. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**:1061 - 1064.
- Wang R. 2011. Signaling pathways for the vascular effects of hydrogen sulfide. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **20**:107 - 112.
- Wassarman P, Jovine L, Litscher E. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biology* **3**:59 - 64.
- 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, Rose P, Tan C, Parkinson D, Moore P. 2010. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**:1147 - 1154.
- Woolley D, Fawcett D. 1973. The degeneration and disappearance of the centrioles during the development of the rat spermatozoon. *The Anatomical Record* **177**:289-301.
- Wray S, Kupittayanant S, Shmygol A, Smith R, Burdyga T. 2001. The physiological basis of uterine contractility: a short review. *Experimental Physiology* **86**:239-246.
- Xia J, Ren D. 2009. Egg coat proteins activate calcium entry into mouse sperm via catsper channels. *Biology of Reproduction* **80**:1092-1098.
- Yanagimachi R, Noda Y. 1970. Ultrastructural changes in the hamster sperm head during fertilization. *Journal of Ultrastructure Research* **31**:465-485.
- Yang G. 2020. H₂S as a potential defense against COVID-19?. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **319**:244-249.
- Yang G et al. 2008. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*. **322**:587 - 590.

- 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.
- Yan H, Du J, Tang C. 2004. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**:22-27.
- Yi Y, Manandhar G, Oko R, Breed W, Sutovsky P. 2007. Mechanism of sperm-zona pellucida penetration during mammalian fertilization: 26S proteasome as a candidate egg coat lysin. *Society of Reproduction and Fertility supplement* **63**:385-408.
- Yuan M, Wu N, Zhu X, Lee C, So R, Lv H, Mok C, Wilson I. 2020. A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science* **368**:630-633.
- 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.
- Zamboni L, Stefanini M. 1971. The fine structure of the neck of mammalian spermatozoa. *The Anatomical Record* **169**:155-172.
- Zaneveld L, Polakoski K, Schumacher G. 1973. Properties of acrosomal hyaluronidase from bull spermatozoa. Evidence for its similarity to testicular hyaluronidase. *The Journal of Biological Chemistry* **248**:564-570.
- Zelinková P. 2019. Sulfan produkující enzymy a jejich funkce v kančích spermíích. [MSc. Thesis]. Czech University of Life Sciences Prague, Prague.
- Zhang H, Zhi L, Moore P, Bhatia M. 2006. Role of hydrogen sulfide in cecal ligation and puncture-induced sepsis in the mouse. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **290**:1193-1201.
- 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 Y, Wang Z, Ho P, Loke Y, Zhu Y, Huang S, Tan C, Whiteman M, Lu J, Moore P. 2007. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats. *Journal of Applied Physiology* **102**:261-268.
- Zimmerman S, Sutovsky P. 2009. The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization. *Journal of Reproductive Immunology* **83**:19-25.
- Zhao Y et al. 2016. Hydrogen Sulfide and/or Ammonia Reduces Spermatozoa Motility through AMPK/AKT Related Pathways. *Scientific Reports* **6**:37884.