

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Sulfan produkující enzymy a jejich funkce v kančích
spermiích**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Petra Zelinková

Obor: Reprodukční biotechnologie

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

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Sulfan produkující enzymy a jejich funkce v kančích spermiiích" 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 11.4.2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí diplomové práce prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D., za vedení práce a pomoc při jejím psaní a zpracování, RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za pomoc a vedení práce v laboratoři a v neposlední řadě také rodině za trpělivost v průběhu vypracovávání diplomové práce.

Sulfan produkující enzymy a jejich funkce v kančích spermiiích

Souhrn

V buňkách je sulfan produkován třemi enzymy: Cystathionin β -syntázou (CBS), cystathionin – γ – lyázou (CSE) a merkaptopyruvát sulfurtransferázou (MPST). Výskyt těchto enzymů v kančích spermiiích nebyl dosud přesněji popsán.

Kančí spermie byly pro pokusy získávány z komerčně dostupných inseminačních dávek. A kapacitovány v kapacitačním médiu v termostatu při 37°C po dobu 30, 60, 90 a 120 minut. Sulfan produkující enzymy (CSE, CBS, MPST) byly sledovány ve spermiiích pomocí metody Western blott a imunocytochemicky. Využity byly komerčně dostupné protilátky proti cystathionine- β -syntáze, cystathionine- γ -lyáze a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáze. Expres sulfan produkujících enzymů byla prokázána jak metodou Western blot tak imunocytochemicky. Expres enzymů se s délkou kapacitace snižovala. Na základě získaných výsledků se lze domnívat, že signální dráha sulfanu je v kančích spermiiích funkční a podílí se na procesu kapacitace.

Klíčová slova: Sulfan, CBS, CSE, MPST, spermie

Enzymes producing sulfan and their functions in boar sperm

Summary

Sulphane is produced in cells by three enzymes: Cystathionine β -synthase (CBS), cystathionine - γ - lyase (CSE) and mercaptopyrrolidine sulfurtransferase (MPST). The presence of these enzymes in boar sperm has not been described yet.

Boar spermatozoa for experiments were obtained from commercially available insemination doses and capacitated in a capacitor medium in a thermostat at 37 ° C for 30, 60, 90 and 120 minutes. Sulfan-producing enzymes (CSE, CBS, MPST) were monitored in sperms by Western blotting and immunocytochemistry. There were used commercially available antibodies against cystathionine- β -synthase, cystathionine- γ -lyase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. The expression of sulfane-producing enzymes has been demonstrated by Western blot and immunocytochemistry. The enzyme expression decreased with length of the capacitation. Based on the results, it can be presumed that the sulphane signaling pathway is functional in boar spermatozoa and is involved in the process of capacitation.

Keywords: Sulphan, CBS, CSE, MPST, spermatozoa

Obsah

1	Úvod	4
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	5
3	Literární rešerše	6
3.1	Spermatogeneze	6
3.1.1	Produkce spermií	8
3.2	Kapacitace	9
3.2.1	Modifikace membrány.....	12
3.2.2	Adenylylcyklázy a cAMP.....	12
3.3	Akrozomální reakce a její průběh	13
	Průběh akrozomální reakce	13
	Stimulace ZP3 a odpověď Ca^{2+}	13
	Vstup Ca^{2+} a následná exocytóza	14
3.4	Sulfan	14
	Enzymy produkující sulfan	15
3.4.1	Vznik sulfanu	17
3.4.2	Katabolismus sulfanu	19
3.4.3	Sulfan ve tkáních	20
3.4.4	Sulfan jako regulátor samčích pohlavních buněk	21
4	Materiál a metody	22
4.1	Materiál	22
4.2	Metody	22
4.2.1	Použité chemikálie a média	22
4.2.2	Kapacitace	23
4.2.3	Western Blot	24
4.2.4	Imunocytochemická detekce proteinů	25
4.2.5	Statistické vyhodnocení	25
5	Výsledky	26
5.1	Průkaz sulfan produkujících enzymů metodou Western Blot	26
5.2	Imunocytochemická detekce sulfan produkujících enzymů	29
6	Diskuze	36
7	Závěr	38
8	Seznam použité literatury	39
9	Seznam příloh	54

1 Úvod

Sulfan (H_2S) je jeden ze tří známých gasotransmiterů. Tvoří se intracelulárně v nízkých koncentracích a funguje jako plynný posel v určitých fyziologických procesech.

Substrátem pro tvorbu endogenního sulfanu je L-cystein, který savci získávají z potravinových zdrojů. Tato aminokyselina obsahující síru je produkována z L-methioninu prostřednictvím tzv. transsulfurace. Transsulfurace je proces, který může být katalyzován jedním ze dvou enzymů transsulfurační dráhy: Cystathionin β -syntázou (CBS) nebo cystathionin – γ – lyázou (CSE). Dalším enzymem podílejícím se na tvorbě sulfanu je merkaptopyruvát sulfurtransferáza (MPST). V mitochondriích produkuje MPST sulfan z 3-merkaptopyruvátu nebo oxiduje obsaženou síru na siřičitan a thiosíran.

Varlata jsou orgánem, který aktivně využívá aminokyseliny obsahující síru. Tyto aminokyseliny slouží také jako substrát pro syntézu glutathionu prostřednictvím glutamát-ligázy. Glutathion hraje ústřední roli při regulaci spermatogeneze. Nízké koncentrace sirovodíku se tedy podílejí na procesu spermatogeneze. Sulfan má také schopnost ochránit zárodečné buňky varlat proti apoptóze indukované teplem prostřednictvím antioxidačního mechanismu.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Sulfan (H₂S) je difusibilní plyn, který patří do skupiny signálních molekul označovaných jako gasotransmitery. Intracelulárně je syntetizován enzymy cystathionine- β -syntázou, cystathionine- γ -lyázou a 3-mercaptopyruvate sulfurtransferázou z L-cysteinu. Funkce a přítomnost sulfan produkujících enzymů v kančích spermích není dostatečně popsána.

Cílem diplomové práce bylo ověřit hypotézu, že signální dráha sulfanu je v kančích spermích funkční a jsou v nich exprimovány sulfan produkující enzymy.

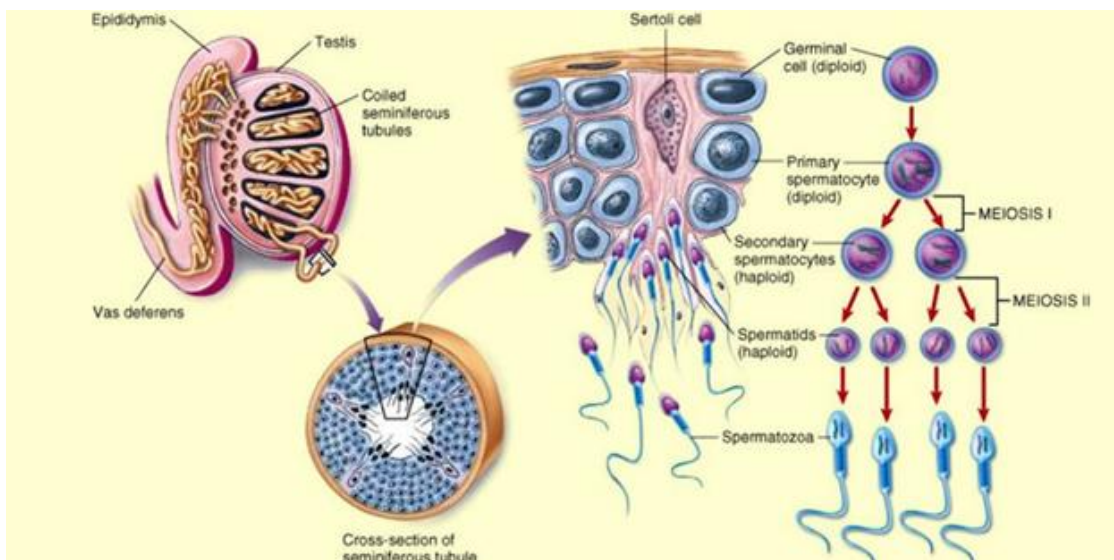
Pro ověření hypotézy byla využita metoda Western Blot a imunodetekce pro stanovení přítomnosti enzymů produkujících sulfan (MPST, CSE, CBS). Dále byla využita využita metoda imunofluorescence pro stanovení exprese hledaných enzymů.

3 Literární rešerše

3.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces, při kterém spermatogonální kmenová buňka prochází třemi postupnými fázemi vývoje (Clermont 1972). Každá fáze je velmi specifická, organizovaná a cykly, v nichž probíhají, jsou přesně časovány (Hess & de Franca 2009).

Epitel semenotvorných kanálků se neskládá pouze z jednoho typu somatických buněk (Sertoliho buňky), ale je zde přítomno i mnoho typů zárodečných buněk. Stádia spermatogeneze jsou: Mitóza, meióza, spermiogeneze, Golgiho fáze, stádium akrozomální čepičky, stádium akrozomální, zrání (Russel et al. 1993).



Obrázek 1 Spermatogeneze, dostupné z: <https://byjus.com/biology/spermatogenesis/>

Mitóza

Spermatogonie jsou diploidní ($2n$) zárodečné buňky, které se dělí mitózou a jsou přítomné na bazální membráně semenotvorného kanálku. Spermatogonie dělíme na dva základní typy. Typ A a typ B. U některých dobře studovaných savců (myši, křasy) pak ještě rozlišujeme další čtyři třídy (Russell et al. 1993).

Meióza

Spermatogonie typu B se dělí mitózou a tvoří dva spermatocyty ve fázi tzv. preleptotene. Tyto buňky pak představují začátek meiotické profáze. Jsou to malé buňky (ve fázi profáze), které zůstávají na bazální membráně. Následné spermatocyty (fáze leptotene a zygotene) prochází přes krevní bariéru (Blood-testis-barrier) nebo Sertoli-Sertoliho bariéru (Russell 1977).

Spermatocyty jsou buňkami meiózy, kterým je třeba věnovat zvláštní pozornost. Dělení meiotických buněk je definováno jedinou fází, ve které najdeme tři typy buněčného dělení:

- a) meióza I. – rozdělení diploidních buněk
- b) tvorba sekundárních spermatocytů
- c) meióza II. – dělení sekundárních spermatocytů

Během spermiogeneze se dramaticky snižuje velikost buněk, a to díky změnám chromatinu a jaderné kondenzaci. Sekundární spermatocyty jsou tedy větší než spermatidy (França & Cardoso 1998).

Spermiogeneze

Transformace sférických, haploidních spermatid ($1n$) na podlouhlé, vysoce kondenzované a zralé spermie, uvolňující se do lumenu semenného tubulu, se nazývá spermiogeneze. Diferenciace spermatid probíhá nejméně ve čtyřech krocích (nebo fázích): Golgi (Golgiho fáze), capping (stádium akrozomální čepičky), acrosomal (fáze akrozomální) a zrání. Tyto kroky jsou užitečné pro identifikaci specifických stadií cyklu semenného epitelu (Hess & de Franca 2009).

Golgiho fáze

Golgiho aparát je velmi důležitý během počátečních kroků spermiogeneze, jako je formace akrozomu, která závisí na schopnosti této organely produkovat vezikuly a granule obsahující enzymatické složky akrosomálního systému, jež pokryjí vývoj jádra spermie. Diferenciace prvních tří kroků kultivace spermatid zahrnuje prominentní Golgiho aparát, který je identifikován barvením Periodic Acid-Schiff, což je reakce používaná k důkazu polysacharidů, při které dochází k jejich oxidaci pomocí kyseliny jodisté, čímž vznikají aldehydy reagující se Schiffovým barvivem a následně vytváří komplex s fialově červeným zabarvením (Russell 1990).

V první fázi mají spermatidy malý, perinukleární Golgiho region bez akrosomálních váčků nebo granulí. V následujících fázích pak ukazují proakrosomální váčky a granule v Golgiho aparátu s následným vytvořením jediné, velké akrosomální granule ve větším váčku. (Leblond & Clermont 1952).

Stadium akrozomální čepičky

Ve stádiu akrozomální čepičky, označované jako capping, se akrozomální granule, jež vznikla v předchozím kroku, dotýká jaderné membrány a váček se začíná zplošťovat do malého víčka nad jaderným povrchem. Dále se akrozomální váček stane velmi tenkým a granule se zplošťuje. Akrozom se dále zplošťuje až na přibližně 1/3 jaderného povrchu. Ke konci této fáze začíná také jádro měnit svůj tvar (Hess 1990).

Akrozomální fáze (Stádium akrozomální, Stádium kaudální manžety)

Ve stádiu kaudální manžety dochází k migraci akrozomálního systému přes ventrální povrch prodlužujícího se spermatidového jádra. V typicky histologických vzorcích je konec této migrace obtížně identifikovatelný, především díky její přítomnosti v různých rovinách vzorku. Rozeznání tohoto specifického stadia spermatogeneze je zpravidla odvozováno podle akrozomálního systému pozorovaného kolem spermatid, nikoliv v podlouhlých buňkách (spermatidách). Toto stádium také zahrnuje kondenzaci chromatinu, protože chromozomy jsou těsněji u sebe. Díky této těsnosti je velmi snadné intenzivní obarvení hematoxylinem, potvrzující tuto skutečnost (De Franca et al. 1995).

Zrání

V případě tvaru a akrozomální migrace jsou jaderní změny menší. Jádro však pokračuje v kondenzaci a akrozom postupně zraje do struktury vyčnívající na povrch a pokrývající téměř celé jádro mimo části spojené s bičíkem. Dále dochází též k odstranění nadbytečné cytoplazmy, čímž dochází k tvorbě prominentních cytoplazmatických laloků, obsahující nepoužité mitochondrie, ribozomy, lipidy a další složky (Russell et al. 1990; Hess et al. 1993; de Franca et al. 1995).

3.1.1 Produkce spermií

Ze spermatogonie dojde ke vzniku spermatocytů po stanoveném počtu mitotických dělení charakteristických pro každý druh. Jako příklad lze uvést dvě až šest rozdílných spermatogonálních generací, jež byly pozorovány u savců. Kromě toho, že počty dělení jsou užitečné pro srovnávací studie mezi různými druhy, je také nezbytná přesná znalost počtu spermatogonálních generací pro lepší pochopení regulačních mechanismů spermatogeneze (Clermont 1972; De Rooij & Russell 2000). Pokud porovnáme spermatogenezi s jinými systémy, které produkují buňky v těle, dojdeme k závěru, že spermatogeneze má největší počet buněčných dělení během své expanze. Takový je aspoň předpoklad.

Například u myši, krysa a prasata je potřeba asi deset generací spermatogonií, které jsou nezbytné pro tvorbu spermatocytů ve fázi preleptotene, z jedné spermatogonální kmenové buňky, zatímco u lidí je tato hodnota mnohem nižší a odhaduje se, že má pouze čtyři mitotické dělení. Kinetika a rychlost ztráty zárodečných buněk má dopad na počet vyrobených spermií (Hess & de Franca 2009).

3.2 Kapacitace

Kapacitace je velmi rychlý proces, po kterém je spermie schopná navázat se na povrch oocyta (na zonu pellucidu). Zonou pellucidou prochází díky akrozomální reakci a hyperaktivaci. Kapacitace nastává po přirozeném páření, kdy sperma projde prostředím dělohy (Bedford 1970).

U některých druhů savců, například u lidí, jsou ejakulované spermie dopraveny do vagíny, odkud musí dále proniknout cervikálním hlenem, v němž ztrácejí některé z povrchově adsorbovaných materiálů. Lidský cervikální hlen navozuje kapacitaci spermií (Zinamen et al. 1989) a hyperaktivaci (Zhu et al. 1992, 1994), ale nikoliv akrozomální reakci (Bielfield et al. 1991). Jen velmi malý počet spermií se dostane z dělohy, kde jsou přítomné neutrofily často napadající spermie (Barratt et al. 1990).

Savčí vejcovod poskytuje vhodné prostředí pro transport spermií, skladování a kapacitaci, sběr oocyta, transport a zrání, oplodnění, a nakonec i dělení časného embrya (Hunter & Rodriguez-Martinez 2004). Spermie, které jsou již plně diferenciovány bez možnosti opravy jakéhokoliv poškození, vyžadují bezpečné útočiště, kde mohou čekat hodiny až dny, než bude vhodná doba k oplodnění. Takové bezpečné místo poskytuje první část vejcovodu, kde část spermií (například po inseminaci) může setrvat v tzv. rezervoáru spermií. (Rodriguez-Martinez et al. 2001). Rezervoár spermií se objevuje u všech druhů studovaných savců. Kapacitace je zde zpomalena (Smith & Nothnick 1997), což prodlužuje jejich životaschopnost. U prasat mohou být spermie uchovány také v děložním krčku, kde vydrží životaschopné po dobu 36 hodin nebo déle (Hunter 1987). Jejich imobilizace v této oblasti je způsobena různými faktory, které pravděpodobně působí v kombinaci složené z omezení pohybu hojně vylučovaným hlenem, který se vyskytuje v děložním krčku a v utero-tubálním spoji (Jansen & Bajpai 1982); dále nižší teploty ve vejcovodu prasat (Hunter & Nichol 1986), a složení tekutiny (koncentrace iontů, hormonů) (Burkman et al. 1984). Pouze omezený počet takto skladovaných spermií se však následně účastní oplození (Hunter 1981).

Při kapacitaci spermií in vivo bylo zjištěno, že spermie kanců zkapacitovaly 2-3 hodiny po vystavení prostředí dělohy a vejcovodu, což je o polovinu kratší doba oproti spermiím, které byly vystaveny pouze prostředí vejcovodu. Tyto nálezy naznačují, že kapacitace trvá různě dlouho v závislosti na prostředí, ve kterém se spermie nachází, a jak rychle dokáže toto prostředí modifikovat povrch membrány spermie (Hunter & Dziuk 1968). Při přirozenném oplodnění jsou spermie postupně vystaveny tekutinám v děloze a následně ve vejcovodech, takže tyto tekutiny jsou schopné regulovat rychlost kapacitace (Rodriguez-Martinez 2007).

Hyperaktivace

Hyperaktivace je typ mobility spermií, který pozorujeme u místa oplodnění. Je popisována jako energický, rychlý, kmitavý pohyb směrem vpřed za hlavičkou s vysokou amplitudou. Byl pozorován u mnoha druhů savců včetně prasat (Suarez & Dai 1992).

Hyperaktivace spermií je základní událostí kapacitace. Hyperaktivní spermie snadněji proniknou skrz husté tekutiny v samičím genitálním traktu či přes zonu pellucidu, kterou bez hyperaktivního pohybu neprojdou a také lépe projdou vejcovodem (Suarez et al. 1991; Suarez & Dai 1992).

Během hyperaktivace prochází spermie řadou komplexních změn. Mezi ně patří například změna v koncentracích iontů (Ca^{2+}) nebo změny na úrovni cytosolu a axonemy. (Murad et al. 1992). Možné axonemální změny mohou souviset s fosforylací bílkovin, o kterých je známo, že jsou zapojeny při motilitě spermií (Tash 1990).

Faktory ovlivňující kapacitaci

Sodík, draslík, hydrogenuhličitan

Ionty sodíku a draslíku jsou nutné pro kapacitaci. Stačí jich však velmi nízké koncentrace (Hyne et al. 1984).

Bikarbonát (hydrogenuhličitan) je přítomen již v době ejakulace (například u lidských spermií), a to díky semenným váčkům, které ho produkují (Okamura et al. 1986). Vysoká koncentrace hydrogenuhličitanů je také v ženském genitálním traktu (Maas et al. 1977). Jedna z funkcí bikarbonátových iontů je umožnit vzestup intracelulárního pH v buňce. Kromě pufrací schopnosti ovlivňuje bikarbonát spermie také funkčně, například stimulací adenylcyklázy (Okamura et al. 1985).

Vápník

Vápník bývá častěji dáván do souvislosti s akrozomální reakcí, avšak i při kapacitaci má určitou úlohu. Například působí přímou interakcí s fosfolipidy, čímž modifikuje jejich fyzikální stav a následně také membránovou tekutost (Fénichel & Parinaud 1995).

Na molekulární úrovni souvisí kapacitace spermií s: 1) aktivací dráhy cAMP / PKA (Harrison, 2004; Krapf et al. 2010); 2) se zvýšením intracelulárního pH (Zeng et al. 1996); 3) se zvýšením intracelulárních koncentrací Ca^{2+} (Ruknudin & Silver 1990); 4) s hyperpolarizací membránového potenciálu spermie (Em) (Zeng et al. 1995; Escoffier et al. 2012); 5) se ztrátou cholesterolu (Cross 1996; Davis et al. 1980) a s jinými lipidovými modifikacemi (Gadella & Harrison 2000); a 6) se zvýšenou fosforylací tyrosinu (Visconti a kol. 1995a; Krapf et al. 2010). Ve všech typech buněk hraje Ca^{2+} základní roli, a to jako druhý posel při řízení buněčných procesů. U spermií ukázaly experimenty centrální úlohu tohoto iontu při regulaci pohyblivosti spermií a akrosomové reakci (Navarrete et al. 2015). Ve spermatu myši byly identifikovány dva transportní systémy Ca^{2+} : 1) Ca^{2+} kanálový komplex Catsper, složený z nejméně 7 podjednotek. Vyřazení každé z nich vede k degradaci všech ostatních podjednotek (Qi et al. 2007). Studie prováděné na myších ukázaly, že Catsper je nezbytný pro hyperaktivaci a oplodnění; 2) systémy vytlačování Ca^{2+} , složené ze skupiny proteinů $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ a proteinových membrán Ca^{2+} ATPázy (Okunade et al. 2004). Ca^{2+} -závislé enzymy mohou být aktivovány přímo Ca^{2+} nebo nepřímo $\text{Ca}^{2+} / \text{Calmodulin}$ (CaM) interakcí. Cíle tohoto komplexu (CaM) ve spermiích jsou: fosfodiesteráza I (Baxendale & Fraser 2005), kalcineurin (Tash et al. 1988) a Calmodulin Kinase II a IV (Wu & Means 2000). Velmi časnou událostí v kapacitaci spermií je aktivace cesty cAMP (Visconti 2009). Aktivace syntézy cAMP probíhá okamžitě po uvolnění spermií z epididymis, kdy přichází do styku s vysokými koncentracemi HCO_3^- a Ca^{2+} přítomnými v semenné tekutině (Carlson et al. 2005; Wennemuth et al. 2003).

Zinek

Zinek je ve spermiích přítomnech ve vysokých koncentracích (především u lidských spermií). Funguje jako membránově stabilizační sloučenina, a proto by mohl být považován spíše za dekapacitační faktor, který snižuje hyperaktivitu a potlačuje kapacitaci. Po přidání zinku ke spermiím křečků a myši došlo k inhibici kapacitace, zatímco akrozomální reakce zůstala neovlivněna. Následně byl zinek opět odstraněn. I když se toto odstranění jeví jako zásadní, nebylo samo o sobě dostačující k vyvolání kapacitace spermií. Zinek tedy mohl být součástí procesu, který spouštěl destabilizaci membrán a/nebo spouštěl jiné události související s tímto procesem (Andrews et al. 1994).

Zinkové ionty hrají zásadní roli v kapacitaci spermií. Regulují klíčové události zodpovídající za získání oplození schopnosti (Kerns et al. 2018).

Existuje mírná negativní korelace mezi obsahem Zn^{2+} a progresivní motilitou spermií u lidí (Henkel et al. 1999). Chelatace spermií Zn^{2+} pomocí 2,3-bis (sulfanyl) butandiové kyseliny, 2,3-dimercaptopropan-1-sulfonátu nebo DL-penicilaminu vede ke zvýšení průměrné přímočaré rychlosti a progresivní pohyblivosti spermií při současném snížení procenta nelineárně se pohybujících spermií (Wroblewski et al. 2003).

Prostatická semenná tekutina s vysokou koncentrací Zn^{2+} hraje klíčovou roli při potlačení předčasné kapacity spermií a poskytují antioxidantní účinky, zatímco nižší koncentrace Zn^{2+} mohou být předpokladem úspěšné akrosomální reakce (Kerns et al. 2018).

3.2.1 Modifikace membrány

Během kapacity dochází k modifikaci membrány spermie. Látky na povrchu membrány získané z nadvarlat nebo semenné plazmy jsou odstraňovány nebo měněny, membránové antigeny jsou přesouvány (Fusi & Bronson 1992; Fusi et al. 1992). Mechanismy zodpovědné za iontové toky jsou aktivovány nebo potlačeny a zvyšuje se fluidita membrány (Wolf et al. 1986) a to především v důsledku změny membránových lipidů (Langlais et al. 1988). Důležitou a často zkoumanou roli zde hraje cholesterol, který ovlivňuje propustnost iontů membránou, vložení proteinů a stabilizuje membránu (Ehrenwald, Foote & Parks 1990). V lidských spermiích byl dále nalezen cholesterol sulfát, který dodává spermatu větší stabilitu membrán oproti samotnému cholesterolu (Langlais et al. 1981).

3.2.2 Adenylylcyklázy a cAMP

Spermie inkubované za aerobních podmínek vytváří reaktivní druhy kyslíku (ROS), jako je třeba superoxidový anion, který spontánně dismutuje na peroxid vodíku (Aitken & Clarkson, 1987; Alvarez et al. 1987). Vzestup hladiny vápníku a tvorba ROS se objevují velmi brzy po zahájení kapacity. (Baldi et al. 1991). Tyto dva procesy mohou být zodpovědné za fyziologickou aktivaci adenylylcyklázy, což má za následek vznik cAMP. Adenylylcykláza hraje důležitou roli v rozvoji kapacity lidských spermií. Ve skutečnosti jsou to látky, které přispívají ke zvýšení intracelulárních koncentrací cAMP, jako je např. forskolin (aktivátor adenylylcyklázy) nebo kofein (Leclerc et al. 1997). Vzniklý cAMP je zapojen do procesů, při němž se spermie stávají motilními (Tash 1990) a také do kapacity (Yanagimachi 1994; Leclerc et al., 1996). Účinek cAMP je následek aktivace protein kinázy A (Garbers et al. 1973). Jsou známy cesty cAMP (přes protein kinázu A, či protein kinázu C), které jsou vzájemně

propojeny a vedou nakonec k akrozomální reakci u lidí (Doherty et al. 1995). Zaznamenávané zvýšení stupně fosforylace proteinů během kapacitace spermií může být výsledkem stimulace kináz a/nebo inhibice fosfatáz (Tash et al. 1990).

3.3 Akrozomální reakce a její průběh

Akrozomální reakce je událost, kterou musí projít spermie mnoha druhů zvířat před spojením s oocytem.

Průběh akrozomální reakce

Akrozomální reakce nastává na zona pellucida. Aktivita agonistů (látek vyvolávajících fyziologickou odpověď) byla také již prokázána v rozpustných extraktech zona pellucida (Florman et al. 1982). Konkrétně se jedná o protein ZP3. Další pozorování, která podporují zařazení agonistické aktivity do ZP3 zahrnují nejen její přítomnost na místě oplození a přímou vazbu tohoto proteinu (ZP3) na spermii (Thaler & Cardullo 1996), ale také ztrátu agonistické aktivity po oplodnění (Bleil & Wassarman 1983). Je třeba poznamenat, že oblast zony pellucidy mnoha savčích druhů je konstruována ze čtyř proteinů (Conner et al. 2005).

Otázka, zda funguje ZP3 nezávisle jako agonista v oblasti zona pellucida, která obsahuje všechny čtyři složky, jsou v současné době nevyřešeny. Množství farmakologických látek a biologických tekutin také indukuje akrozomální reakci, přesto není jistý jejich biologický význam. Jedním z příkladů je progesteron, který je uvolňován buňkami cumulus oophorus (Osman et al. 1989) a vyvolává agonistické účinky zóny pellucidy in vitro (Roldan et al. 1994).

Stimulace ZP3 a odpověď Ca^{2+}

Interakce spermie se zona pellucida spouští řadu odpovědí, které jsou potřebné pro indukci přísunu vápenatých iontů (Ca^{2+}) (Arnoult et al. 1999).

ZP3 depolarizuje membránový potenciál dostatečně silně na to, aby otevřel TRPC – kanály (aktivovány pomocí receptorů spřažených s G-proteiny a tyrozinkinázovými receptory). Tato reakce je však poměrně pomalá a dá se očekávat, že existuje jiný spouštěč (Arnoult et al. 1996). Alternativní mechanismy regulace kanálů mohou být ve spermii zprostředkovány např. fosforylací tyrosinu (Arnoult et al. 1997). Tyto prvky přenosu signálu ZP3 se nemohou vzájemně doplňovat a fungují spíše paralelně. V důsledku toho jsou tyto kroky představovány jako dvě oddělené cesty, které se skládají z přechodného vstupu Ca^{2+} , G proteinu a pH reakce. Obě tyto cesty však musí fungovat, aby byl zajištěn efektivní přenos (Florman & Ducibella 2006).

Vstup Ca^{2+} a následná exocytóza

Rychlý vzestup Ca^{2+} spouští uvolnění akrosomálních granulí.

Uznání, že kanály TRPC zprostředkovávají a jsou hlavní součástí trvalého vstupu Ca^{2+} , který je spuštěn ZP3, vyústil ve snahu o identifikaci asociovaných proteinů vázajících Ca^{2+} s těmito kanály. To vedlo k identifikaci enkurinu, vícedoménového proteinu obsahující na prolin bohatou N-koncovou oblast s předpokládaným SH_3 (malá proteinová doména) a motivy WW domény (proteinová doména, specifické interakce s ligandy) a C-koncovou oblast, která váže TRPC2 (protein, Transient receptor potential cation) (Sutton et al. 2004).

Enkurin má vlastnosti adaptorového proteinu (bílkovina, která se účastní signalizační kaskády, ale sama nemá enzymatickou aktivitu), který váže na SH_3 a WW doménu TRPC kanály aktivované ZP3, čímž se sestaví signalizační modul v místě aktivity ZP3. Jeden takový signalizační modul se zdá být 1-fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) (Sutton et al. 2004).

Porozumění mechanismů, kterými zona pellucida reguluje akrozomální reakci je klíčové pro modely oplození a také díky nim můžeme vést strategii rozvoje kontroly plodnosti. Kroky této signalizace by se dali shrnout takto: 1) rané události tj. aktivace G-proteinu, intracelulární alkalizace a přechodný vstup Ca^{2+} ; 2) trvalý přísun Ca^{2+} , jehož hlavní část je nesená kanály TRPC; 3) následné události včetně aktivace fosfoinositid-dependentních protein kináz a následné procesy spojené s přístupem Ca^{2+} enkurinem, proteinu vázajícího TRPC a PI3 kinázu. (Garbers & Kopf 1980; Garbers 1989)

3.4 Sulfan

Sirovodík (Sulfan, H_2S) je jeden ze tří známých gasotransmiterů, které se podílí na určitých fyziologických procesech, a to včetně reprodukčních funkcí (Qiao-li & Jun-bao 1986).

Intracelulárně je sulfan tvořen v buňce a slouží jako plynň buněčný posel. V buňkách se nachází v nízkých koncentracích (Wang 2003).

Za fyziologicky relevantních podmínek, tj. ve vodném roztoku při pH 7,4, je jedna třetina sulfanu nedisociovaná a dvě třetiny disociují na H^+ a HS^- (hydrosulfidový ion), který se může následně rozložit na H^+ a sulfidový iont (S^{2-}). Nicméně, poslední zmíněná reakce nastává pouze při vysokém pH, kdy S^{2-} ionty se nevyskytují in vivo v podstatných množstvích. Hydrosulfid sodný (NaHS) se běžně používá jako donor sulfanu, protože disociuje na Na^+ a HS^- . HS^- pak částečně váže H^+ za vzniku nedisociované H_2S (sulfanu). Podobně jako NO (oxid dusnatý) a CO (oxid uhelnatý) je sulfan lipofilní a volně proniká do plazmatických membrán.

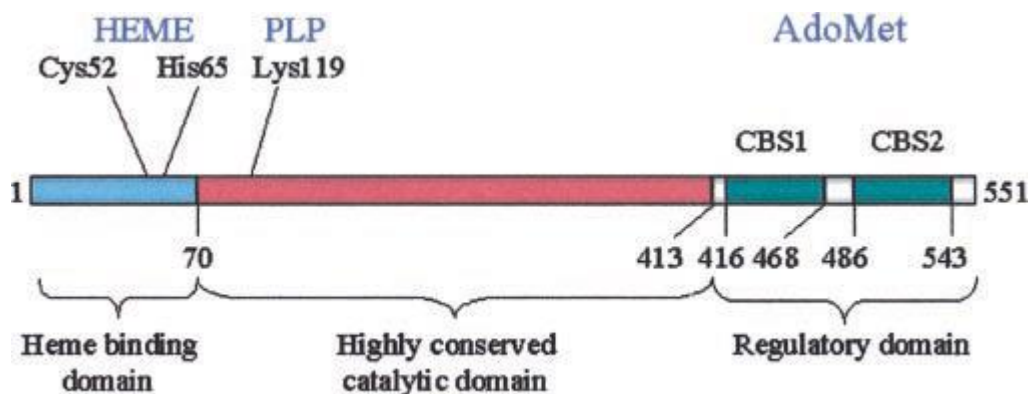
Ale pouze díky částečné disociaci jsou membrány relativně méně propustné pro sulfan oproti CO a NO. Sulfan je detekovatelný v séru a ve většině tkáních v koncentraci přibližně 50 μM . Jeho fyziologická úroveň v mozku je až třikrát vyšší než v séru a ve skutečnosti se blíží až toxické koncentraci (Łowicka, & Bełtowski 2007).

Enzymy produkující sulfan

V buňkách je sulfan produkován třemi enzymy: Cystathionin β -syntázou (CBS), cystathionin – γ – lyázou (CSE) a merkaptopyruvát sulfurtransferázou (MPST).

CBS

Cystathionin β -syntáza katalyzuje pyridoxal 5-fosfát (PLP) pomocí reakce, ve které je thiolát v L-homocysteinu nahrazován hydroxylovou skupinou z L-serinu. Allosterický aktivátor, S- adenosyl – L – methionin (AdoMet) zvyšuje aktivitu CBS přibližně 3krát a pravděpodobně se váže na C-terminální regulační doménu (Kery et al. 1998).



Obrázek 2 Struktura domény lidského CBS ukazující N-terminální doménu, která váže hem, katalytickou doménu a C-terminální regulační doménu, která obsahuje dvě „CBS“ domény (CBS 1 a CBS 2). Autor: Jane Oliverius (Zdroj: Miles and Kraus 2004)

Velké množství mutací v různých oblastech lidské CBS byly nalezeny u pacientů s homocystinurií (lidské dědičné onemocnění, které se vyznačuje vysokou hladinou aminokyseliny L-homocysteinu v plazmě (Kraus et al. 1999; Mudd et al. 2001). Mutace v genu CBS mohou měnit buď mRNA nebo stabilitu enzymu, aktivitu, vazbu na PLP a hem nebo narušit alosterickou regulaci (Miles & Kraus 2004).

Enzymy, které mají koenzym PLP, katalyzují širokou škálu rozmanitých reakcí souvisejících s metabolismem aminokyselin. PLP enzymy jsou rozděleny do 4 rodin na základě podobností v jejich terciální (trojrozměrné) struktuře, sekvenci, sekundární struktuře a na základě hydrofobních profilů (Grishin et al. 1995).

CBS je součástí druhé největší skupiny (rodiny), jejíž členové vykazují významnou homologii v jádře, katalytické oblasti, a naopak malou podobnost v N- a C- koncovém prodloužení. Lidský CBS gen je transkripčně regulován dvěma promotorovými oblastmi. Hlavní promotor je ovlivňován růstovým faktorem fibroblastů. Jeho snižování je závislé na hladině inzulínu, vyčerpání živin... Druhý promotor je regulován pomocí specifických reakcí (Miles & Kraus 2004).

Základem užitečných testovacích metod je také reakce L-cysteinu a 2-merkaptoethanolu za vzniku S-hydroxyethyl- L- cysteinu a H₂S (Jhee, McPhie & Miles 2000).

CSE

Lidský cystathionin – γ – lyáza je enzym závislý na pyridoxal – 5' - fosfátu (PLP), který hraje roli v transsulfurační cestě, která převádí homocystein na cystein a je jedním ze dvou hlavních enzymů, které mohou katalyzovat tvorbu sirovodíku, což je důležitá plynná signální molekula (Zhu et al. 2008).

CSE transkript, proteiny a enzymatická aktivita byly detekovány v játrech, ledvinách a v nižší úrovni také v tenkém střevě a žaludku potkanů a myší. Při vývoji myších jater a ledvin se hladiny exprese CSE proteinu zvyšují s věkem až do stáří 3 týdnů a následně dochází k poklesu v ledvinách, zatímco v játrech zůstávají hladiny konstantní. Exprese CSE byla nalezena také v myších hepatocytech (Ishii et al. 2004).

MPST

Merkaptopyruvát sulfurtransferáza byla nalezena v krysích játrech, ale bylo o ní známo pouze málo, a to především díky nestabilitě a také ztíženému očištění od ostatních látek. MPST je enzym velmi rozšířený jak v prokaryotech, tak v eukaryotech (Meister 1953; Wood & Fiedler 1953). Čistý enzym byl poprvé získán roku 1995 (Nagahara et al. 1995), přičemž cDNA byla klonována opět z krysích jater (Nagahara & Nishino 1996).

MPST je mimo jiné enzym, který katalyzuje transsulfuraci. Při otravě kyanidem jsou napadeny hlavně meta-loproteiny a karbonylové kyseliny obsahující proteiny. Obranou proti této otravě je právě reakce tzv. transsulfurace, při které se kyanid metabolizuje na méně toxický thiokyanát (Nagahara et al. 1999). U savců se předpokládá, že se MPST účastní také dalších procesů. Kromě detoxikace kyanidu se hovoří například o karcinogenezi, anaerobní metabolismus cysteinu a methioninu, sulfurace po transkripci tRNA či imunitní funkce (Iciek & Wlodek 2001).

Sulfan v savčích buňkách potlačuje mitochondriální funkce inhibicí cytochrom-c oxidázy. Podávání H₂S savcím buňkám však může sloužit také jako donor elektronů a anorganický zdroj energie (Módis et al 2013).

MPST se vyskytuje převážně v ledvinách, jaterních buňkách, srdečních buňkách či v epitelu proximálního tubulu (Naghara et al 1998). Je členem rodiny sulfutransferáz a sdílí 60% sekvenční podobnost s rhodanem, což je prototypový člen této rodiny. Oba tyto proteiny mají aktivní stranu s katalytickým zbytkem cysteinu, což je důsledkem společného evolučního vývoje (Spallarossa et al 2004).

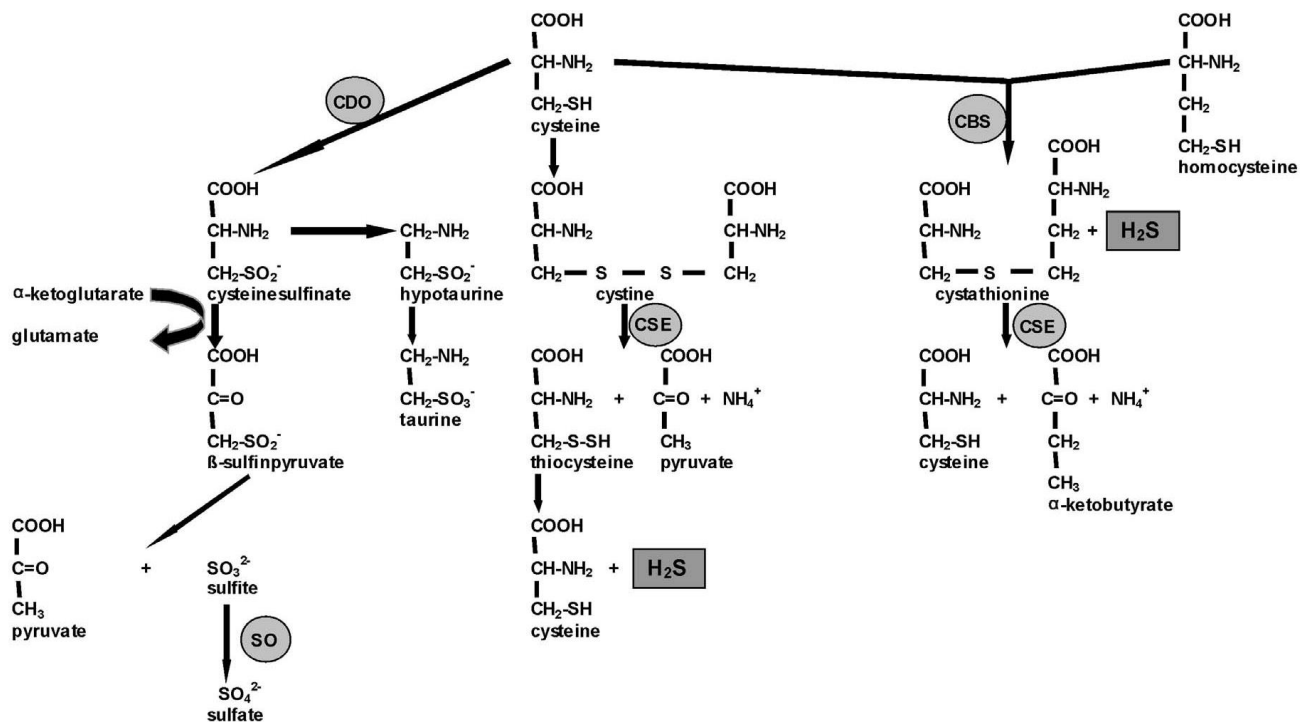
3.4.1 Vznik sulfanu

Sulfan se produkuje ve významném množství ve většině tkání. Nejvyšší míra produkce byla zaznamenána v mozku, kardiovaskulárním systému, játrech a ledvinách (Łowicka, & Bełtowski 2007).

Jediným substrátem pro tvorbu endogenního sulfanu je L-cystein, aminokyselina obsahující síru pocházející z potravinových zdrojů, produkovaná z L-methioninu prostřednictvím tzv. transsulfurace (Stipanuk 2004).

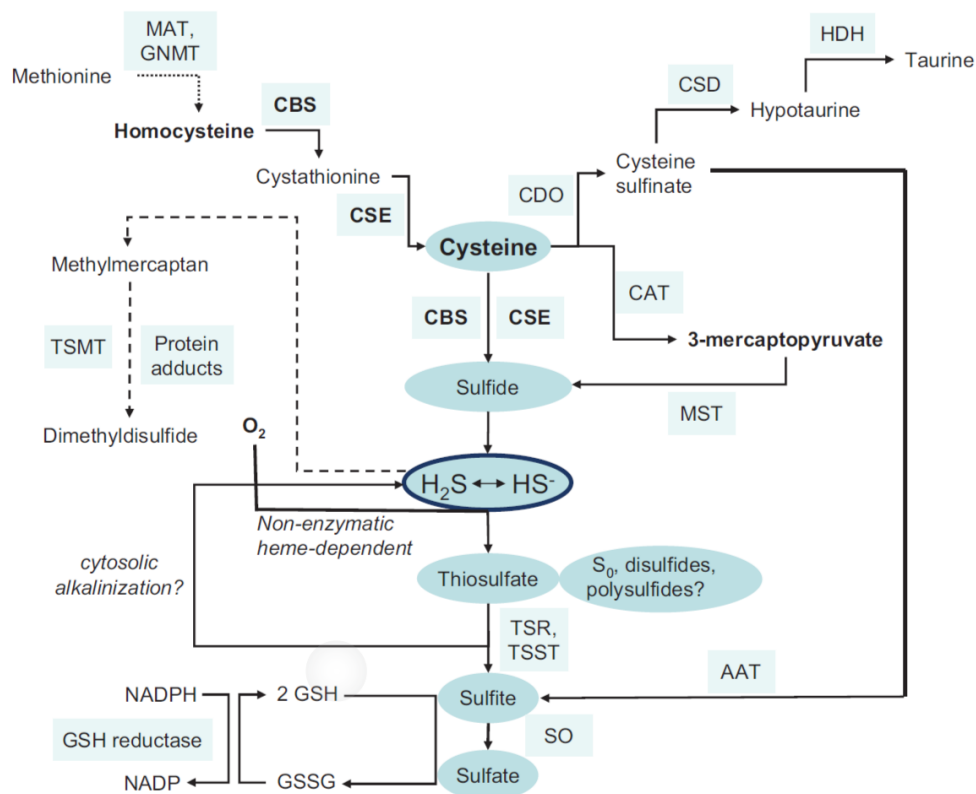
Existují dvě hlavní cesty katabolismu cysteinu. Jednou z nich je oxidace -SH skupiny cystein dioxigenázy (CDO) na cystein sulfinát. Ten pak může být dekarboxylován na hypotaurin nebo převeden na pyruvát. Druhá dráha, označovaná jako "desulfhydrace", je spojena s odstraněním cysteinového atomu síry bez jeho oxidace a vede k produkci sulfanu. Tento proces může být katalyzován jedním ze dvou enzymů transsulfurační dráhy: cystathionin a-syntáza (enzym CBS) a cystathionin a-lyázy (enzym CSE). Oba enzymy jsou závislé na pyridoxal 5'-fosfát (vitamín B6), ale liší se v mechanismu tvorby sulfanu. CSE katalyzuje cystin (cystein disulfidu) na thiocystein, pyruvát a amoniak. Thiocystein se pak nonenzymaticky rozkládá na cystein a sulfan. Hlavní mechanismus produkce sulfanu pomocí CBS pravděpodobně zahrnuje kondenzaci homocysteinu s cysteinem za vzniku cystathioninu a sulfanu je uvolněn během této reakce (Chen et al. 2004).

Je třeba poznamenat, že tato reakce úzce souvisí s reakcí katalyzovanou CBS v transsulfurační cestě (Obrázek 3). Obě cesty (CBS a CSE) jsou široce rozšířené. Avšak v centrální nervové soustavě převládá cesta s enzymem CBS, zatímco v kardiovaskulárním systému pozorujeme převahu tvorby sulfanu pomocí enzymu CSE (Stipanuk 2004).



Obrázek 3 Metabolismus cysteinu. CBS – cystathionin -syntáza, CDO – cystein dioxygenáza, CSE – cystathionin -lyáza, SO – sulfid oxidáza (Łowicka, and Beltowski (2007))

Dalším enzymem podílejícím se na tvorbě sulfanu je MPST (3-merkaptosulfurtransferáza) (Obrázek 4). Jeho přítomnost byla potvrzena v epitelu proximálního tubulu ledvin, v hepatocytech, v srdeční tkáni a také v mozku (Selhub 1999). MPST je enzym podílející se na tvorbě sulfanu v myokardu (Swaroop et al. 1992). V mitochondriích produkuje MPST sulfan z 3-merkaptopyruvátu nebo oxiduje obsaženou síru na siřičitan a thiosíran. V cytosolu je thiocystein tvořen CSE a ten může působit jako akceptor síry přenesené z 3- merkaptopyruvátu pomocí MPST (Elsely, Fowkes & Baxter 2010). Expresse CSE a CBS byla potvrzena u myši, potkanů i u reprodukčních pochodů u lidí, avšak exprese MPST zde nebyla (Patel et al 2009; Srilatha et al 2009).



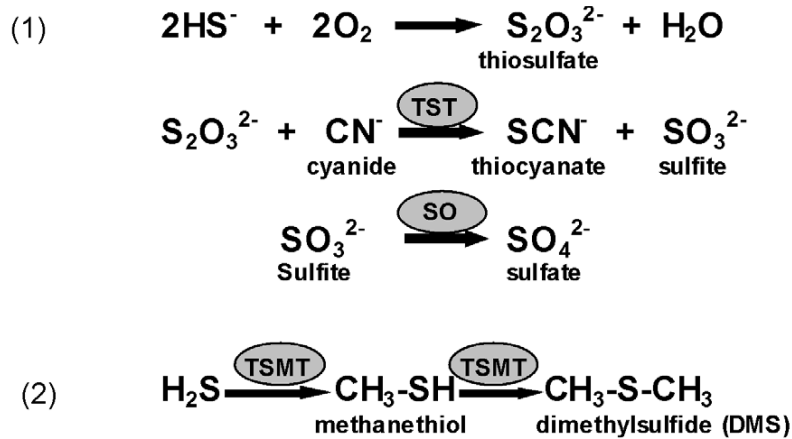
Obrázek 4 Metabolismus L-cysteinu a H₂S: Primární enzymatické cesty produkce H₂S využívá tkáňové specifické enzymy cystathionin-g-lyazu (CSE) a cystathionin-b-syntazu (CBS) za použití L-cysteinu jako substrátu. V mitochondrii může být L-Cystein konvertován cystein aminotransferazou (CAT) na 3-mercaptopyruvát, substrát pro produkci H₂S při využití enzymu merkaptopyruvát sulfurtransferázy (MPST) (zdroj: Elsey et al. 2010).

3.4.2 Katabolismus sulfanu

Sulfan se rychle oxiduje zejména v mitochondriích. Zpočátku na thiosulfát, který se dále konvertuje na siřičitan a síran (Obrázek 6). Oxidace sulfanu na thiosíran je pravděpodobně neenzymatický proces spojený s respiračními mechanismy mitochondrií (Searcy 1996). Konverze thiosíranu na siřičitany je katalyzována thiosíranem - kyanid sulfotransferáza (TST), který přenáší síru z thiosíranu na kyanid nebo další akceptory (Picton et al. 2002). Sulfid, který pochází z této reakce, se rychle oxiduje sulfátovou oxidázou na sulfát. Proto je za fyziologických podmínek sulfát hlavním konečným produktem metabolismu sulfanu, i když většina síranu v moči pochází z oxidace cysteinu spíše než z thiosíranu odvozeného od sulfanu. I když se vylučuje thiosulfát močí, jeho koncentrace je menší než 1% síranu (Kamoun 2004).

Druhou cestou metabolismu sulfanu je metylace thiol-S-methyltransferázy (TSMT) na methanthiol a dimethylsulfid (Furne et al. 2001) (Obrázek 6). Tato reakce se vyskytuje hlavně v cytosolu. Některé studie zpochybňují význam této cesty, přinejmenším v gastrointestinálním traktu (Levitt et al. 1999; Picton et al. 2002).

Poslední možností katabolismu sulfanu je jeho vazbat na methemoglobin za vzniku sulfhemoglobinu. Protože hemoglobin může také vázat NO a CO je to společná cesta katabolismu pro všechny tři plynové vysílače (Łowicka, & Bełtowski 2007).



Obrázek 5 Katabolismus sulfanu, (Łowicka, and Bełtowski (2007)

3.4.3 Sulfan ve tkáních

Sulfan přispívá k udržování ochrany a k regeneraci gastrointestinální sliznice. To napomáhá mnoha protizánětlivým účinkům, včetně inhibice adherence leukocytů k endotelu a migraci leukocytů do míst zánětu. Naopak inhibice endogenní syntézy sulfanu vede ke ztrátě integrity sliznice a ke zvýšenému výskytu zánětu sliznice (Wallace 2010).

Při zkoumání tvorby endogenního sulfanu uvnitř dělohy krysy a ženy, bylo prokázáno, že enzymová funkce CBS a CSE je ovlivněna hladinou kyslíku. Za hypoxických podmínek je produkce sulfanu zvýšena, což může hrát významnou roli v problematice preeklampsie (Patel et al. 2009).

Syntéza sulfanu enzymy CBS a CSE probíhá také ve vejcovodu. Produkováný sulfan zde reguluje kontrakce svaloviny, které napomáhají průchodu časného embrya vejcovodem. Změny v signalizaci sulfanem, včetně ztlumení nebo zesílení aktivity indukované farmakologickými nebo genetickými metodami, měly za následek zadržetí embrya případně zpomalení vývoje embrya ve vejcovodu myši (Ning et al. 2014).

U samců endogenně produkovaný sulfan zprostředkovává erektilní funkce (Srilatha et al. 2006). Další vliv má sulfan na spermatogonální proliferaci a relaxaci hladkého svalstva (Sugiure et al. 2005).

3.4.4 Sulfan jako regulátor samčích pohlavních buněk

Varlata jsou orgánem, který aktivně využívá aminokyseliny obsahující síru. Tyto aminokyseliny slouží také jako substrát pro syntézu glutathionu prostřednictvím glutamát-ligázy. Glutathion hraje ústřední roli při regulaci spermatogeneze (Sugiure et al 2005). Samci myši, kteří mají nedostatek β -glutamyltranspeptidázy vykazují atrofie varlat souběžně s oligospermii (Kumar et al. 2000). Exogenně aplikovaný sulfan chrání varlata i spermie před zánětlivým a oxidačním poškozením. (Wang et al. 2018).

Tekutina vylučovaná semenotvornými kanálky obsahuje dostatečné množství glutathion S - transferázy, která přispívá k přenosu testosteronu do tekutiny (Mukherjee et al. 1999).

S-adenosylmethionin (SAM) dekarboxyláza představuje hlavní cestu pro biosyntézu polyaminů, které jsou nezbytné pro zrání Sertliho buněk a buněk zárodečných (Shubhada et al. 1989).

CSE je lokalizováno v Sertoliho buňkách a v nezralých zárodečných buňkách zahrnujících spermatogonie, zatímco CBS je exprimováno nejen v Sertoliho buňkách a v zárodečných buňkách, ale také v Leydigových buňkách (Oi et al. 2001).

Všechny tři enzymy (CBS,CSE i MPST) jsou exprimovány v testikulárních zárodečných buňkách. Při zvýšené teplotě se hladiny CSE a CBS snížili, zatímco u MPST nebyla pozorována žádná významnější změna. Po tepelném zvýšení se snížila také hladina sulfanu.

Endogenní produkce sulfanu může být tedy narušena tepelným šokem. Získané výsledky v této studii naznačily, že sulfan může ochránit zárodečné buňky varlat proti apoptóze indukované teplem prostřednictvím antioxidačního mechanismu (Li et al 2015).

Výskyt sulfan produkujících enzymů ve spermích kanců nebyl doposud podrobněji popsán.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

Spermie

V experimentu byl používán ejakulát odebraný od kanců plemene Landrace linie 9120 z komečních inseminačních dávek z chovné stanice PROAGRO NYMBURK a.s.. Použito bylo komerční ředidlo SUS, motilita 85%, dávka 80-100 ml, koncentrace 5×10^7 spermií/ml, uchovávání při 17°C.

Příprava vzorku:

Z dávek byly okamžitě po dovezení odebrány vzorky, které byly kapacitovány. Vytvořeny byly 4 skupiny s rozdílnou dobou kapacitace (30 minut, 60 minut, 90 minut, 120 minut). V každé z těchto skupin byla kapacitována kontrolní skupina (kapacitované spermie), experimentální skupina (kapacitované spermie s přidavkem donoru sulfanu) a kontrolní skupina s DMSO, jelikož donor sulfanu byl rozpuštěn v DMSO. Po kapacitaci byly spermie použity pro Western Blot a následnou imunodetekci a k vlhké fixaci pro imunofluorescenci.

4.2 Metody

4.2.1 Použité chemikálie a média

Pro kapacitaci bylo použito médium **TL-HEPES-PVA** v následujícím složení (na 100 ml media):

NaCl (0,6663 g)	Sorbitol (0,2186 g)
KCl (0,0239 g)	NaHCO ₃ (0,0168 g)
NaH ₂ PO ₄ (0,0041 g)	CaCl ₂ .2H ₂ O (0,0294 g)
Sodium DL-lactate (0,14 ml)	Gentamicin (0,0025 ml)
MgCl ₂ .6H ₂ O (0,0102 g)	Penicillin G (0,0065 g)
HEPES (0,2383 g)	Poly(vinyl-alcohol) (0,01 g)
Sodium pyruvate (0,0022 g)	

Tabulka 1 Složení kapacitačního média TL-HEPES-PVA

Používané chemikálie byly vyrobené firmou Sigma-Aldrich s.r.o, USA; NaCl, KCl a NaH₂PO₄ vyrobeny firmou Lach-ner s.r.o, Neratovice
pH Kapacitačního média srovnat na 7,3-7,4.

12% separační gel

Destilovaná voda (3,5 ml)	10% dodecylsírán sodný (100 ml)
30% roztok akrylamidu (4 ml)	10% persíran (APS; 70 μ l)
Pufř (1,5 M Tris; 2,5 ml)	TEMED (4,5 μ l)

Tabulka 2 Složení 12 % separačního gelu pro WesternBlot

Chemikálie vyrobeny firmou GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden; akrylamid SIGMA-ALDRICH s.r.o, USA

15% separační gel

Destilovaná voda (2,5 ml)	10% dodecylsírán sodný (100 ml)
30% roztok akrylamidu (5 ml)	10% persíran (APS; 70 μ l)
Pufř (1,5 M Tris; 2,5 ml)	TEMED (4,5 μ l)

Tabulka 3 Složení 15 % separačního gelu pro WesternBlot

Chemikálie vyrobeny firmou GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden; akrylamid SIGMA-ALDRICH s.r.o, USA

4% zaostřovací gel

Destilovaná voda (1,25 ml)	10% SDS (0,025 ml)
Pufř (0,5 M TRIS; 0,625 ml)	10% APS (50 μ l)
30 % roztok akrylamidu (0,325 ml)	TEMED (3,8 μ l)

Tabulka 4 Složení 4 % zaostřovacího gelu pro WesternBlot

Chemikálie vyrobeny firmou GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden; akrylamid SIGMA-ALDRICH s.r.o, USA

4.2.2 Kapacitace

Pro kapacitaci bylo použito kapacitační médium TL-HEPES-PVA.

5 ml ejakulátu stočeno (RT, 10 minut, 300xg) 2x opláchnuto PBS (SIGMA-ALDRICH s.r.o, USA), doplněno do 5 ml.

Kapacitace probíhala ve 3 typech medií. Kontrolní skupina byla kapacitována v samotném kapacitačním mediu, kontrolní skupina s DMSO byla kapacitována v kapacitačním mediu s přídatkem DMSO (SIGMA-ALDRICH s.r.o, USA) (koncentrace 150 μ mol.l⁻¹) a experimentální skupina byla kapacitována v kapacitačním mediu s přídatkem donoru sulfanu (Dichloromethane complex, SIGMA-ALDRICH s.r.o, USA) (koncentrace 150 μ mol.l⁻¹).

Všechny tři vzorky byly následně rozpipetovány po 0,5 ml do vzorků (20 vzorků kontrolní skupiny, 20 vzorků kontrolní skupiny s DMSO, 20 vzorků experimentální skupiny s donorem H₂S). Kapacitace probíhala v termostatu při teplotě 37 °C, čas kapacitace rozdělen do čtyř skupin (30 minut, 60 minut, 90 minut a 120 minut).

Jednotlivé vzorky byly následně zpracovány pro imunodetekci pomocí Western blot a imunocytochemickou detekci proteinů.

4.2.3 Western Blot

K pokusům byl použit 12 % separační gel pro stanovení enzymů CSE a CBS a 15 % separační gel pro stanovení MPST.

Separací gel byl naplněn do stojánků a překrytý H₂O. Po 30 minutách byla voda z povrchu vylita a na separační gel se naněs 4 % gel zaostřovací.

Aparatura byla naplněna elfo-pufrem (Stacking gel buffer, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) (ředěný v H₂O 1:5). Elektroforesa probíhala prvních 20 minut při 80 V, poté bylo elektrické napětí navýšeno na 150 V a při tomto napětí běží elektroforesa hodinu.

Získané gely se dále použily pro elektroblotting. Elektrický proud byl při blotování nastaven na 500 mA a doba elektroblottingu byla 1,5 hodiny. Po uplynutí této doby byla membrána opláchnuta v destilované vodě a obarvena v barvě Ponceau (SIGMA-ALDRICH s.r.o, USA) (stačí 30-60 sekund) a následně opět promyta (2 x pomocí PBS). Obarvená membrána byla vložena do 5 % roztoku mléka (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) v PBS na 1 hodinu.

Pro imunodetekci byla membrána promyta v PBS s 0,05 % Tweenem 20 (SIGMA-ALDRICH s.r.o, USA). Hotová membrána se dále inkubovala se specifickou protilátkou (anti-CBS, anti-CSE, anti-MPST, ThermoFischer SCIENTIFIC, USA). Všechny protilátky byly naředěny na koncentraci 1:250 v PBS.

Druhý den byla membrána propláchnuta 3x v PBS s 0,05 % Tweenem po 10 minutách a následně byla inkubována se sekundární protilátkou. Pro pokus byla použita sekundární protilátka Anti-rabbit (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) s koncentrací 1:100 000. Po uplynutí doby inkubace (1 hod) byly membrány opět promyty v PBS s 0,05 % Tweenem a dále ještě 2x po 5 minutách v samotném PBS.

Po vizualizaci byla provedena denzitometrická analýza pomocí programu Image Studio Lite Ver 5.2.

4.2.4 Imunocytochemická detekce proteinů

Při kapacitaci bylo odebráno po jednom vzorku od každé skupiny a dále byl připraven vzorek ejakulovaných spermií. Vzorky byly 2x promyty a následně byl odsát supernatant. Na podložní sklo bylo nanášeno 20 μ l suspenze spermií v PBS a 50 μ l vymraženého aceton:methanolu (LACH-NER s.r.o, Neratovice; 1:1 v:v). Tento postup byl použit u každé skupiny a od každé skupiny bylo takto vytvořeno 5 skl. V každém experimentu bylo připraveno 5 skl ejakulovaných spermií a po 5 sklech 30', 60', 90' a 120' minut kapacitace od každé skupiny. Dále bylo na vzorky nanášeno 150 μ l SuperBlocku (ThermoFischer SCIENTIFIC, USA) a skla byla 30 minut inkubována ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Po oplachu destilovanou vodou byla na skla nanášena primární protilátka (králičí anti-CBS, anti-MPST a anti-CSE, ThermoFischer SCIENTIFIC, USA; ředění 1:100 v PBS). Na kontrolní skla bylo nanášeno pouze PBS. Skla byla inkubována přes noc při 4°C ve vlhké komůrce. Následně byla skla opláchnuta destilovanou vodou a nanášena sekundární protilátka (anti rabbit-Alexa 495; ThermoFischer SCIENTIFIC, USA; ředění 1:100 v PBS) a inkubována při pokojové teplotě po dobu 30 minut ve vlhké komůrce ve tmě. Po inkubaci byla skla opláchnuta destilovanou vodou a zamontována pomocí VectaShield s DAPI (Vector Laboratories, INC. USA) Takto připravené preparáty byly uchovávány při 4°C a poté snímány konfokálním mikroskopem (Zeiss LSM 800) při zvětšení 630x. Intenzita signálu stanovená jako průměrná intenzita signálu v jednotlivých spermiích byla hodnocena pomocí počítačové analýzy obrazu NIS-Elements AR 4.30.01 (Nicon, Japan).

4.2.5 Statistické vyhodnocení

Experimenty byly zopakovány 3krát. Analýzou obrazu získané hodnoty průměrné intenzity signálu byly podrobeny statistické analýze. Statistická analýza byla prováděna v programu Microsoft Excel. Byla použita dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) pro zhodnocení vlivu délky kapacitace a vlivu přídatku donoru sulfanu a dále dvouvýběrový t-test pro zhodnocení rozdílu průměrné intenzity signálu v kapacitovaných a ejakulovaných spermiích. Stanovená hladina statistické významnosti byla $p < 0,05$. Hodnoty byly vyjádřeny jako relativní vztažené k průměrné intenzitě signálu ejakulovaných spermií.

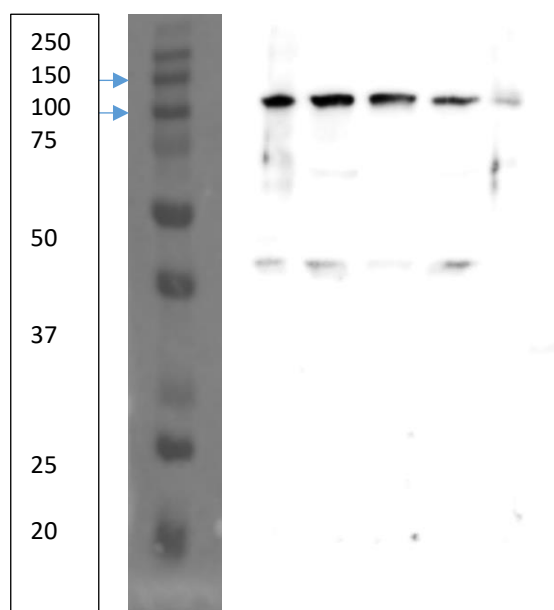
5 Výsledky

5.1 Průkaz sulfan produkujících enzymů metodou Western Blot

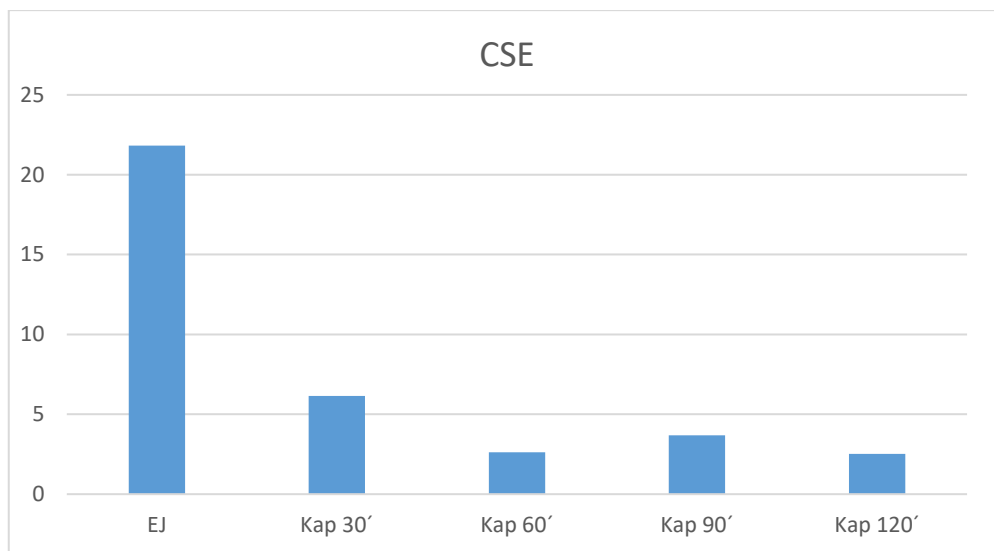
Sulfan produkující enzymy byly v kančích spermiích sledovány pomocí imunodetekce metodou Western Blot , Všechny tři sulfan produkující enzymy, CSE, CBS a MPST byly nalezeny jak v ejakulovaných tak v kapacitovaných spermiích. Denzitometrická analýza ukázala na snižující se množství jednotlivých enzymů během kapacitace.

Cystathionin – γ – lyáza (CSE)

Ve vzorcích spermií byl pomocí imunodetekce nalezen protein o velikosti cca 120 kDa (Obrázek 6), který odpovídá hledanému proteinu CSE (molekulová hmotnost 115 kDa). Množství CSE bylo nejvyšší u ejakulovaných spermií a v průběhu kapacitace se snižovalo (graf 1).



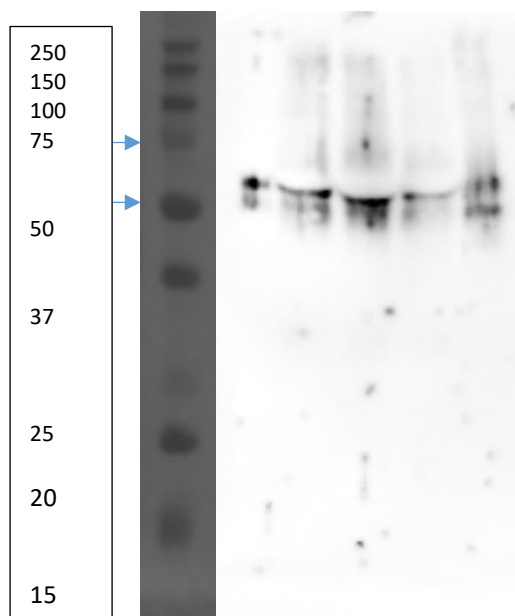
Obrázek 6 Imunodetekce pomocí protilátky anti- CSE



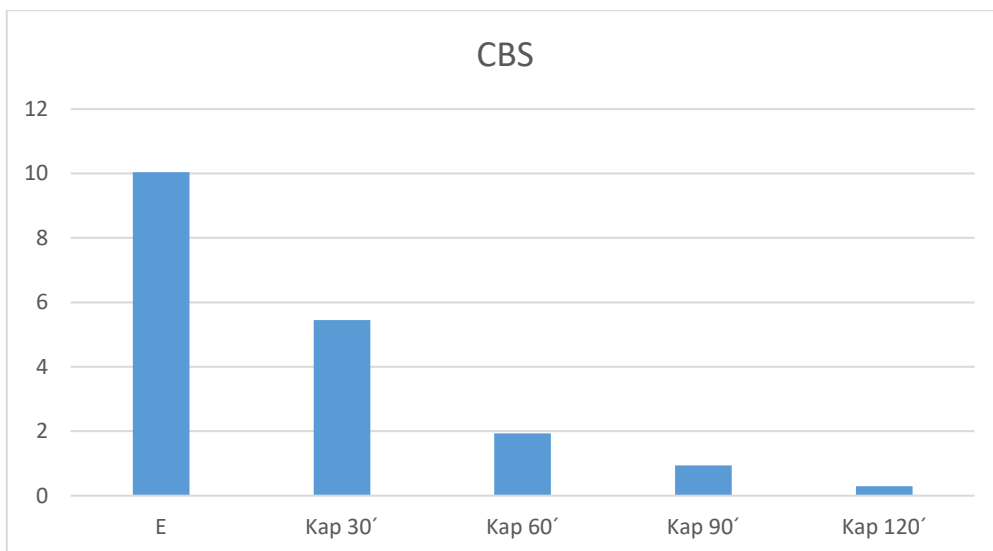
Graf 1 CSE v ejakulovaných a kapacitovaných kančích spermích prokázána metodou Western Blot Ej – Ejakulované spermie, Kap 30' – spermie kapacitované po dobu 30 minut, KAP 60' - spermie kapacitované po dobu 60 minut, KAP 90'- spermie kapacitované po dobu 90 minut, KAP 120'- spermie kapacitované po dobu 120 minut

Cystathionin β -syntáza (CBS)

Také CSE byla v kančích spermích prokázána (Obrázek 7.) Protein měl molekulovou hmotnost cca 65 kDa, což odpovídá molekulové hmotnosti CSE (61 kDa). Množství CBS bylo nejvyšší u ejakulovaných spermíí a v průběhu kapacitace se snižovalo (graf 2).



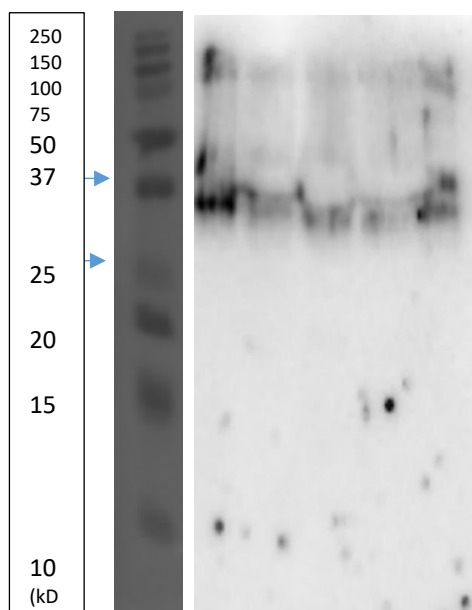
Obrázek 7 Imunodetekce pomocí protilátky anti -CBS



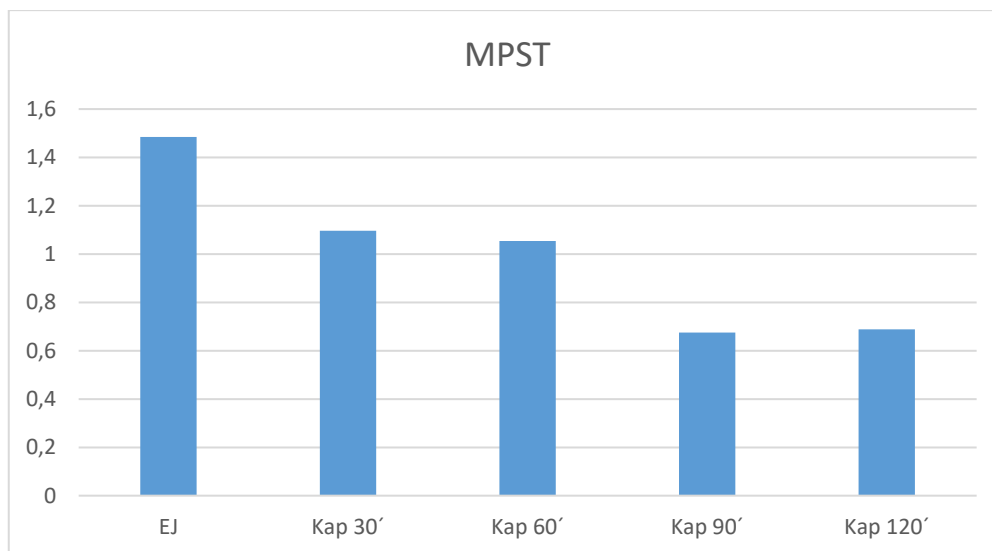
Graf 2 CBS v ejakulovaných a kapacitovaných kančích spermích prokázána metodou Western Blot Ej – Ejakulované spermie, Kap 30' – spermie kapacitované po dobu 30 minut, KAP 60' - spermie kapacitované po dobu 60 minut, KAP 90' - spermie kapacitované po dobu 90 minut, KAP 120' - spermie kapacitované po dobu 120 minut

Merkaptopyruvát sulfurtransferáza (MPST)

MPST byla ve vzorcích ejakulovaných a kapacitovaných kančích spermích byla rovněž zjištěna (Obrázek 8). Molekulová hmotnost nalezeného proteinu byla cca 35 kDa, což opět odpovídá uváděné molekulové hmotnosti MPST (33 kDa). Množství MPST bylo nejvyšší u ejakulovaných spermích a v průběhu kapacitace se snižovalo (graf 3).



Obrázek 8 Imunodetekce pomocí protilátky anti -MPST



Graf 3 MPST v ejakulovaných a kapacitovaných kančích spermích prokázána metodou Western Blot Ej – Ejakulované spermie, Kap 30' – spermie kapacitované po dobu 30 minut, KAP 60' - spermie kapacitované po dobu 60 minut, KAP 90' - spermie kapacitované po dobu 90 minut, KAP 120' - spermie kapacitované po dobu 120 minut

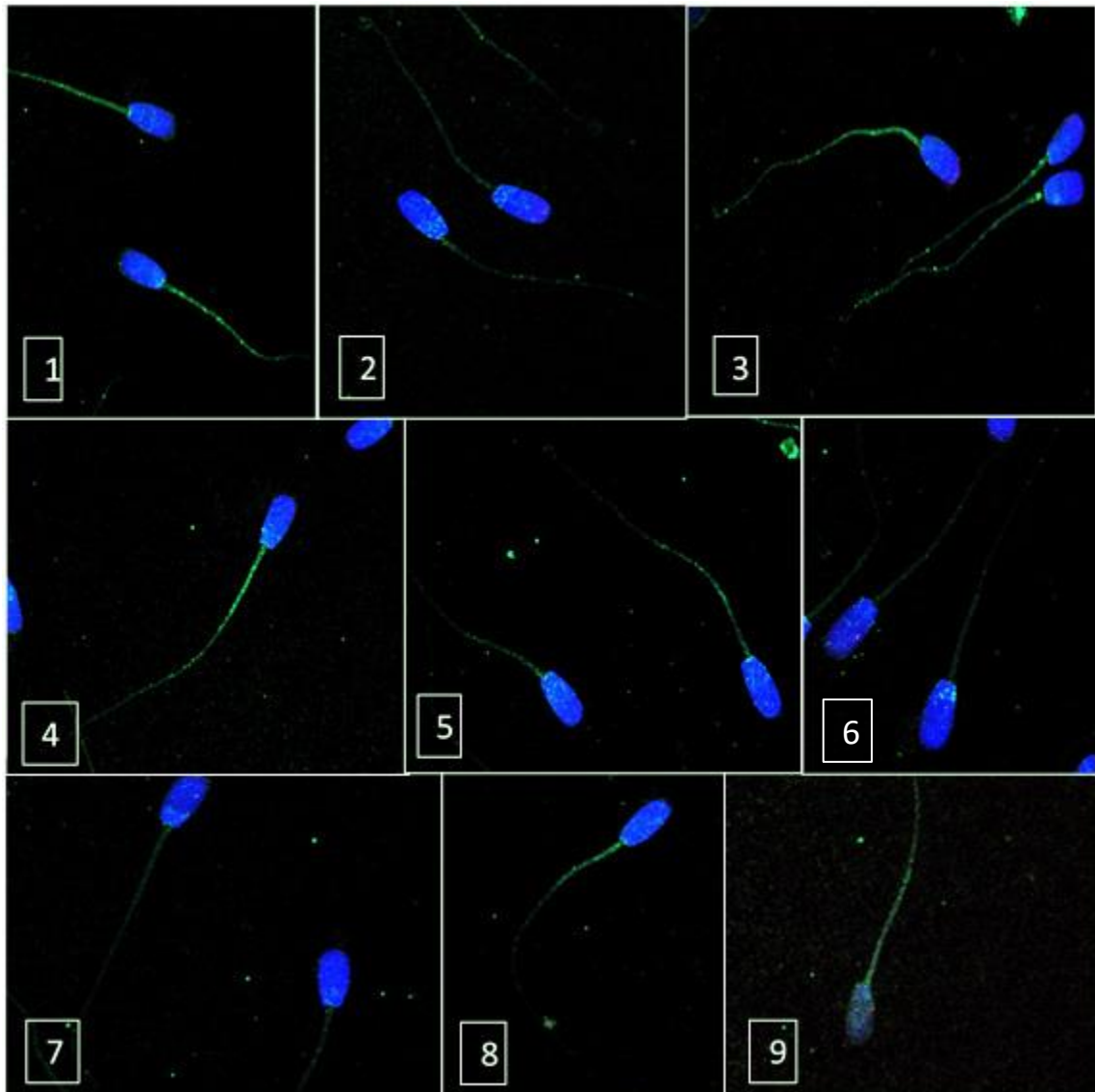
5.2 Imunocytochemická detekce sulfan produkujících enzymů

Sulfan produkující enzymy byly v kančích spermích sledovány imunocytochemickou metodou. Po inkubaci s protilátkami byly spermie snímány konfokálním mikroskopem. Ve všech vzorcích spermíí byl zjištěn signál, i když intenzita signálu se s délkou kapacitace. Průměrná intenzita signálu, byla vyjádřena relativně a vztažena k průměrné intenzitě signálu v ejakulovaných spermích.

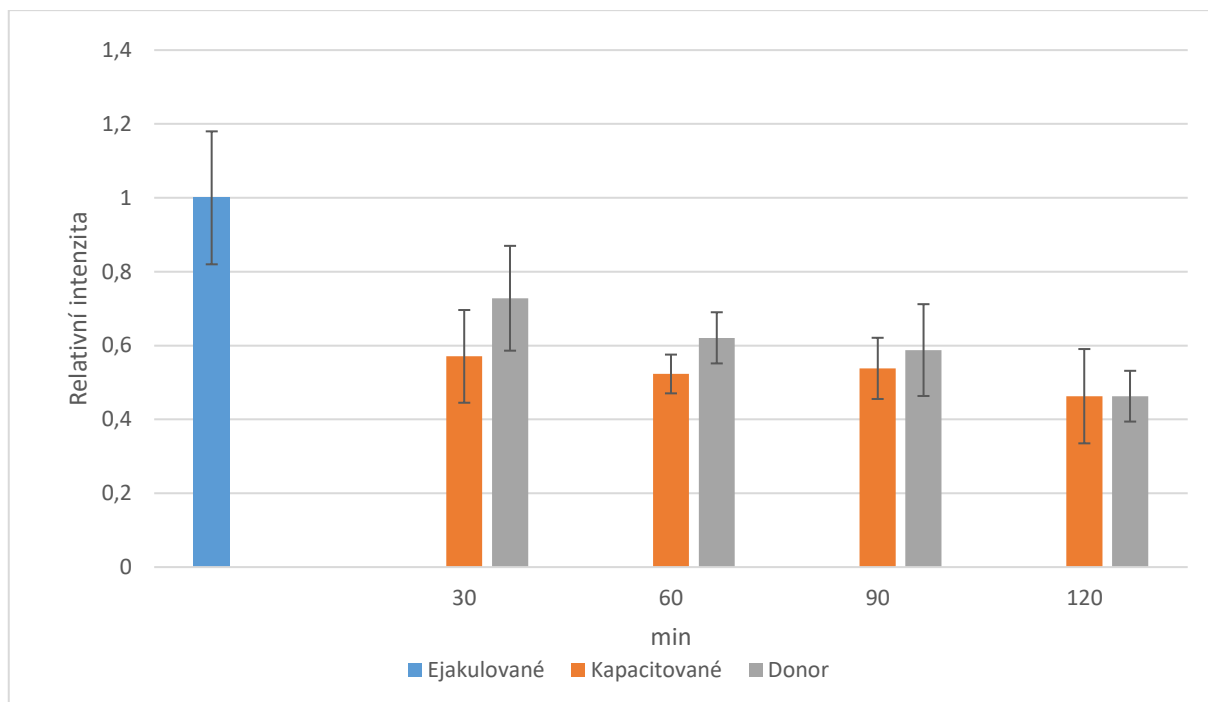
Cystathionin – γ – lyáza (CSE)

Intenzita signálu CSE byla nejvyšší v ejakulovaných spermích a během kapacitace se statisticky významně snižovala. Signál byl zjištěn zejména v bičíku spermie. Statisticky významný rozdíl v intenzitě signálu ale nebyl zjištěn mezi ejakulovanými ejakulovanými spermii a mezi spermii kapacitovanými 30 minut. U spermíí kapacitovaných 6é a více minut již byl rozdíl v intenzitě signálu signifikantní.

Vliv inkubace v kapacitačním médiu v přítomnosti donoru mělo sice intenzitu signálu statisticky významný vliv, ale pouze při hladině významnosti $P= 0,05$ (graf 4). Při hladině významnosti $P= 0,001$ nebyl rozdíl mezi spermii inkubovanými v médiu suplementovaném donorem sulfanu a mezi spermii inkubovanými v nemodifikovaném médiu signifikantní.



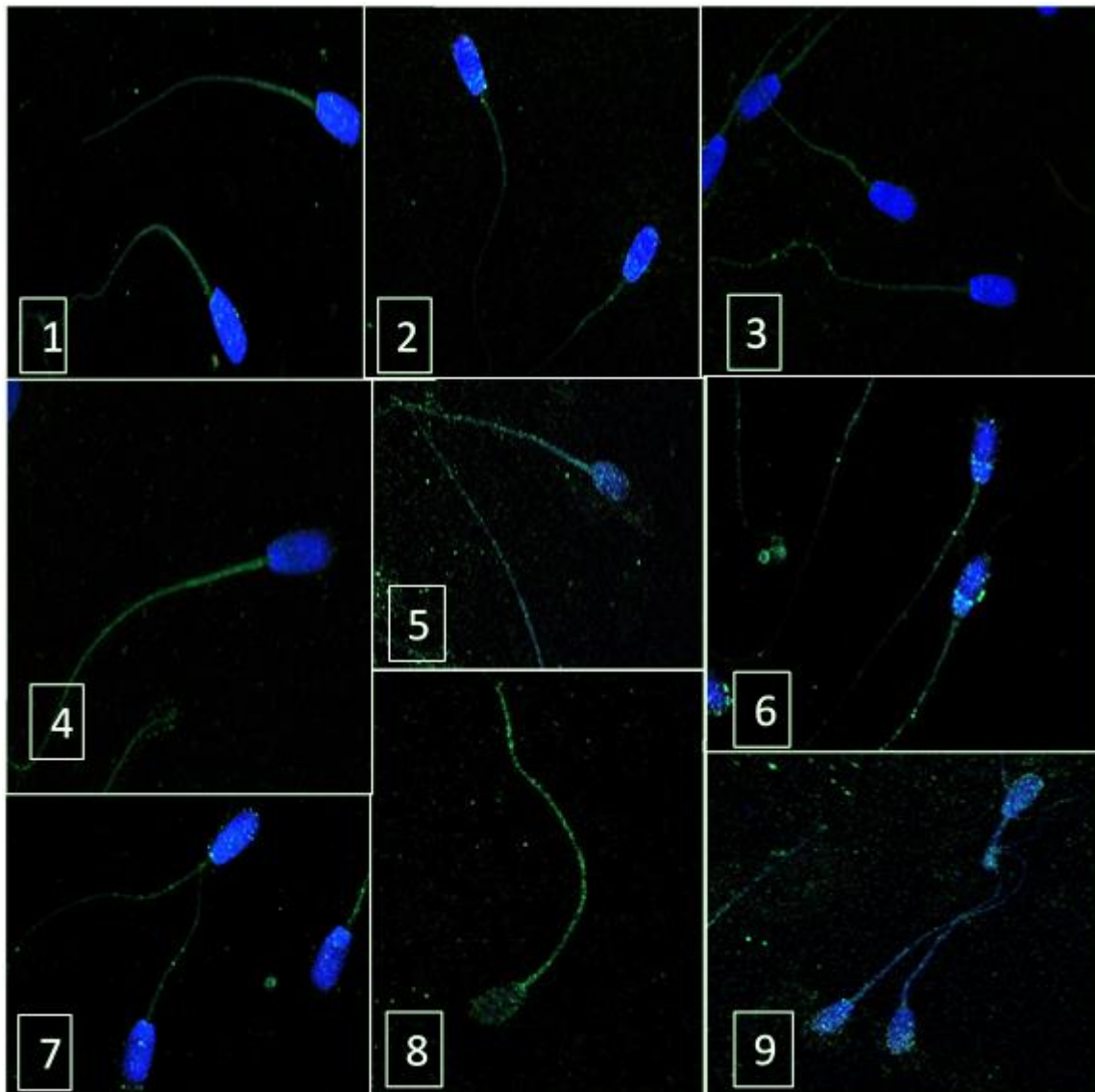
Obrázek 9 Imunocytochemická detekce CSE ve spermiích kance, chromatin obarven DAPI (modře), CSE obarvem Alexou 495 (zeleně), zvětšení 630x, 1 – Ejakulované, 2- Kapacitované 30 minut, 3- Kapacitované 60 minut, 4- Kapacitované 90 minut, 5- Kapacitované 120 minut, 6- Kapacitované s donorem H₂S 30 minut, 7- Kapacitované s donorem H₂S 60 minut, 8- Kapacitované s donorem H₂S 90 minut, 9- Kapacitované s donorem H₂S 120 minut



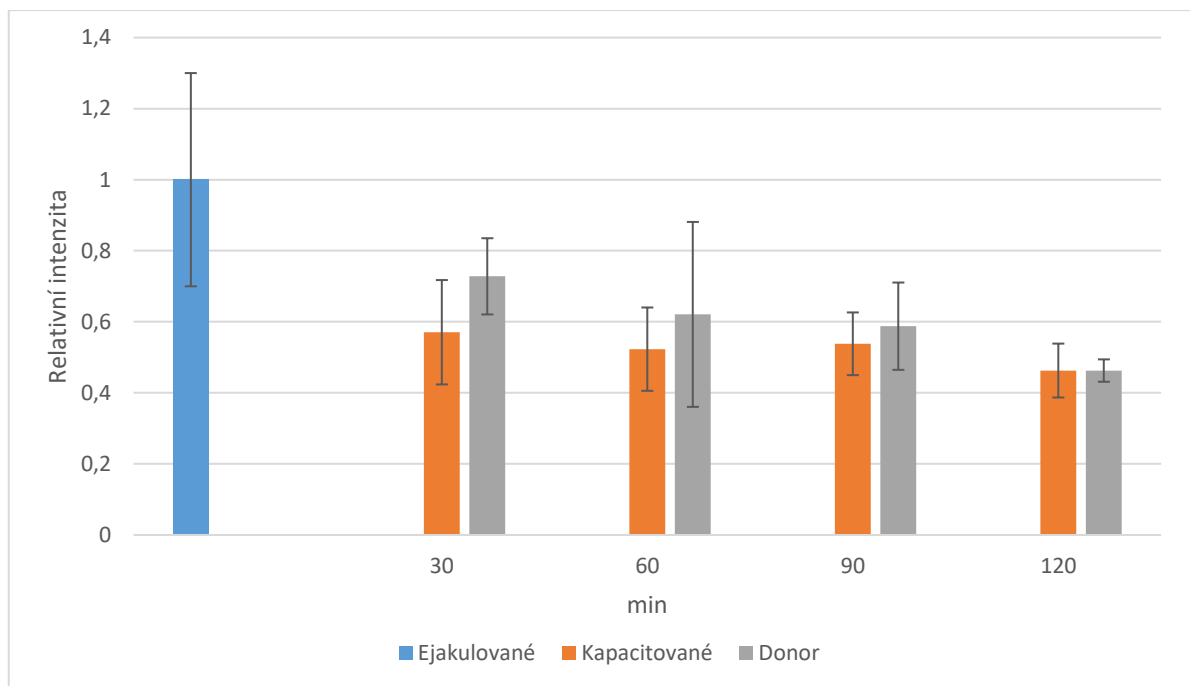
Graf 4 Intenzita signálu u spermií kance: relativní intenzita CSE u ejakulovaných, kapacitovaných spermií a kapacitovaných spermií v médiu s přidavkem donoru, Intenzita signálu byla vyjádřena a relativně vztažena k intenzitě signálu v ejakulovaných spermiích, 30 – po 30 minutách kapacitace, 60 – po 60 minutách kapacitace, 90 – po 90 minutách kapacitace, 120 – po 120 minutách kapacitace

Cystathionin β -syntáza (CBS)

Také intenzita signálu CBS byla nejvyšší v ejakulovaných spermích a během kapacitace se statisticky významně snižovala. Signifikantní byl rovněž rozdíl mezi intenzitou signálu v ejakulovaných spermích a kapacitovaných spermích, a to již po 30 minutách inkubace v kapacitačním médiu. Signál byl zjištěn zejména v bičíku spermie. Vliv inkubace v kapacitačním médiu suplementovaném donorem sulfanu na intenzitu signálu neměl statisticky významný vliv (graf 5).



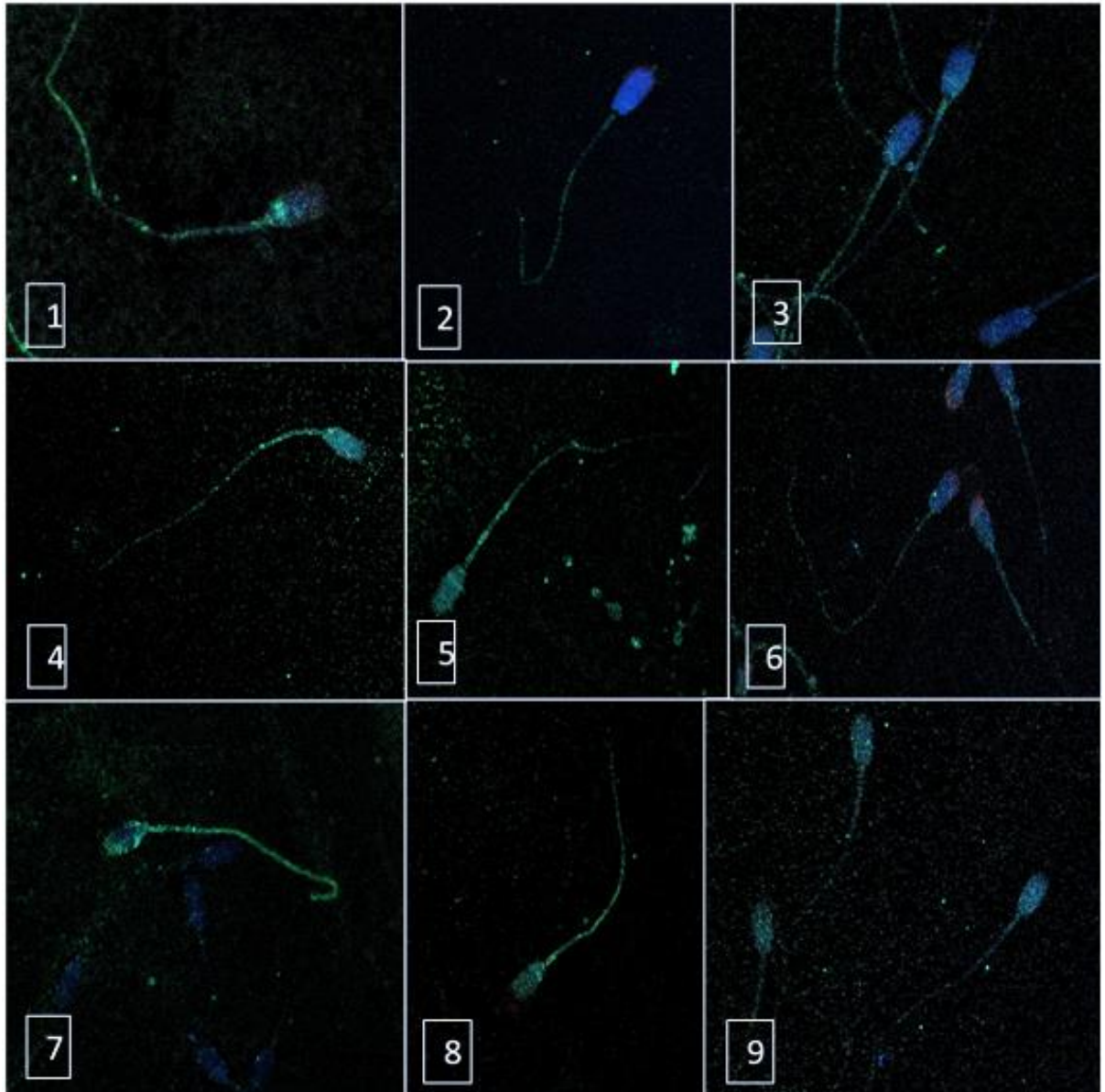
Obrázek 10 Intenzita signálu spermie kance: exprese CBS ve spermích kance, chromatin obarven DAPI (modře), CBS Alexou 495 (zeleně), zvětšení 630x, 1 – Ejakulované, 2- Kapacitované 30 minut, 3- Kapacitované 60 minut, 4- Kapacitované 90 minut, 5- Kapacitované 120 minut, 6- Kapacitované s donorem H2S 30 minut, 7- Kapacitované s donorem H2S 60 minut, 8- Kapacitované s donorem H2S 90 minut, 9- Kapacitované s donorem H2S 120 minut



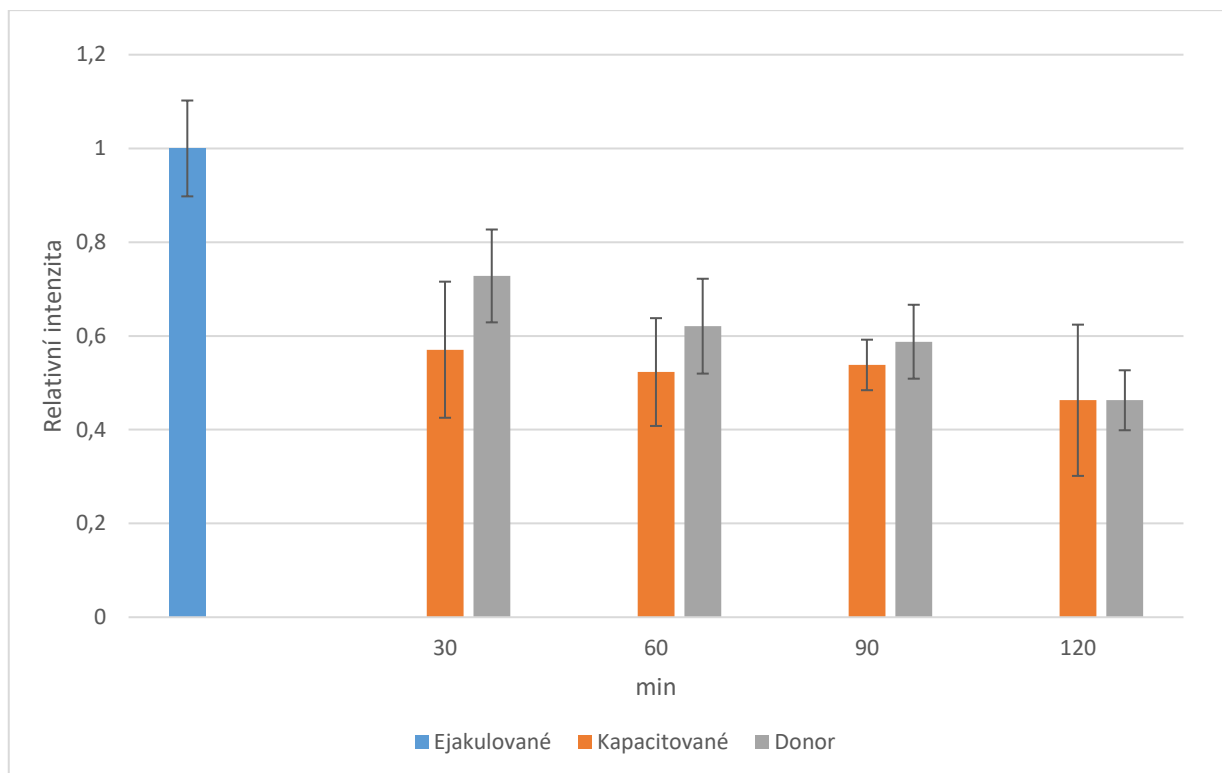
Graf 5 Intenzita signálu u spermií kance: relativní intenzita CBS u ejakulovaných, kapacitovaných spermií a kapacitovaných spermií v médiu s přidavkem donoru, Intenzita signálu byla vyjádřena a relativně vztažena k intenzitě signálu v ejakulovaných spermiích, 30 – po 30 minutách kapacitace, 60 – po 60 minutách kapacitace, 90 – po 90 minutách kapacitace, 120 – po 120 minutách kapacitace

Meraptopyruvát sulfurtransferáza (MPST)

MPST byla nalezena v bičíku i v hlavičce spermie (Obrázek 11). Relativní intenzita signálu byla nejvyšší u ejakulovaných spermií a během kapacitace se statisticky významně snižovala. Rozdíl mezi intenzitou signálu v ejakulovaných spermiích a kapacitovaných spermiích byl signifikantní po 30 minutách inkubace spermií v kapacitačním médiu, ale statisticky významně nižší byl ve spermiích inkubovaných v médiu s přidavkem donoru až po 60 min inkubace (graf 6).



Obrázek 11 Intenzita signálu spermií kance: exprese MPST ve spermiích kance, chromatin obarven DAPI (modře), MPST Alexou 495 (zeleně), zvětšení 630x, 1 – Ejakulované, 2- Kapacitované 30 minut, 3- Kapacitované 60 minut, 4- Kapacitované 90 minut, 5- Kapacitované 120 minut, 6- Kapacitované s donorem H2S 30 minut, 7- Kapacitované s donorem H2S 60 minut, 8- Kapacitované s donorem H2S 90 minut, 9- Kapacitované s donorem H2S 120 minut



Graf 6 Intenzita signálu u spermií kance: relativní intenzita MPST u ejakulovaných, kapacitovaných spermií a kapacitovaných spermií v médiu s přídavkem donoru, Intenzita signálu byla vyjádřena a relativně vztažena k intenzitě signálu v ejakulovaných spermiích, 30 – po 30 minutách kapacitace, 60 – po 60 minutách kapacitace, 90 – po 90 minutách kapacitace, 120 – po 120 minutách kapacitace

6 Diskuze

V diplomové práci byla sledována přítomnost sulfan produkujících enzymů v kančích spermích. Zapojení sulfanu do regulace reprodukčních procesů je již známo. U samců endogenně produkováný sulfan například zprostředkovává erektilní funkce (Srilatha et al. 2006) sulfan má vliv má také na spermatogonální proliferaci a relaxaci hladkého svalstva (Sugiure et al. 2005). U prasat byla funkce sulfanu u gamet potvrzena u oocytů. Inhibice enzymů zodpovědných intracelulárně za produkci sulfanu zhoršila projevy stárnutí u in vitro kultivovaných oocytů a naopak přítomnost donoru sulfanu potlačovala u oocytů apoptózu (Krejčová et al., 2015).

V našich experimentech jsme prokázali v kančích spermích přítomnost všech tří hledaných enzymů: cystathionin β -syntázy (CBS), cystathionin – γ – lyázy (CSE) a merkaptopyruvat sulfurtransferázy (MPST). Tyto enzymy zatím nebyly v kančích spermích v dostupné literatuře popsány, i když v samčím reprodukčním traktu byly enzymy produkující sulfan nalezeny již dříve u potkanů v Sertolihových buňkách a v nezralých zárodečných buňkách a také v Leydigových buňkách (Oi et al. 2001). V lidských spermích byla zatím popsána exprese CSE a CBS, nikoliv však MPST (Patel et al 2009; Srilatha et al 2009).

V našich experimentech se množství sulfan produkujících enzymů signifikantně snižovalo v závislosti na délce kapacitace. Teng et al. (2013), který sledoval sulfan produkující enzymy ve spermii myši, popsal rostoucí množství enzymů při probíhající kapacitaci. Tento fakt může být dán například u kanců velmi častou spontánní kapacitací ejakulovaných spermii. V experimentech byly použity inseminační dávky získávané z inseminační stanice kanců, které obsahovaly malé procento spontánně kapacitovaných spermii. Dalším důvodem může být fakt, že během kapacitace rychle klesala viabilita spermii. Prezentované výsledky jsou součástí komplexního experimentu, ve kterém byla rovněž sledována motilita spermii během kapacitace. Při dlouhodobé kapacitaci (90 -120 min) se parametry motility výrazně zhoršovaly ve srovnání s 30 min kapacitací (výsledky nejsou zahrnuty do této práce).

Sulfan se v savčích buňkách podílí na regulaci hladiny volných kyslíkových radikálů (ROS). U myši sulfan produkováný CBS zabraňuje nadměrné tvorbě ROS v mitochondriích, čímž je chrání před apoptózou a varlata tak chrání před oxidativním stresem (Teng et al. 2013). Bylo zjištěno, že v savčích buňkách sulfan potlačuje mitochondriální funkce inhibicí cytochrom-c oxidazy (Módis et al 2013). Lze tedy předpokládat, že i u kančích spermii bude sulfan podobným způsobem ovlivňovat oxidativní stres a zlepšovat motilitu spermii.

V našich experimentech jsme zjistili signifikantní rozdíl v expresi CSE u spermiích inkubovaných v kapacitačním médiu s přídavkem donoru, ale tento rozdíl byl těsně významný jen při hladině významnosti $P=0,05$. K potvrzení nebo vyvrácení tohoto zjištění by bylo třeba experimenty zopakovat. Spíše se však na dosavadních základech výsledků přikláníme k domněnce, že suplementace kapacitačního média donorem sulfanu expresi sulfan produkujících enzymů neovlivňuje. Naopak podle morfologie spermií z hodnocených preparátů byl vliv donoru spíše negativní. To by odpovídalo zjištění, které uvádí Zhao et al. (2016), kteří popsali snížení motility spermií vystavených působení donoru sulfanu.

Nicméně přítomnost sulfan produkujících enzymů v kančích spermiích a změna jejich exprese v průběhu kapacitace dává předpoklad pro domněnku, že CSE, CBS a MPST jsou zapojené do regulace kapacitace kančích spermií. Pro potvrzení úlohy sulfanu v kapacitaci a v řízení motility spermií je však třeba dalších experimentů, stejně tak jako pro popsání signální dráhy, kterou sulfan ve spermích ovlivňuje.

7 Závěr

Cílem práce bylo prokázat přítomnost enzymů, které jsou v buňkách zodpovědné za produkci sulfanu ve spermiích kance. Získané výsledky potvrdily stanovenou hypotézu, že v kančích spermiích jsou všechny tři enzymy CSE, CBS a MPST exprimovány a lze tedy předpokládat, že signální dráha sulfanu je v kančích spermiích funkční. Expresie enzymů se snižovala v závislosti na délce kapacity. Je tedy pravděpodobné, že CSE, CBS a MPST jsou zapojené do regulace kapacity. Pro potvrzení úlohy sulfanu v kapacitaci je však třeba dalších experimentů. Do budoucna by bylo třeba tuto domněnku potvrdit např: pomocí inhibice jednotlivých sulfan produkujících enzymů.

8 Seznam použité literatury

Aitken, R. J., & Clarkson, J. S. 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, **81**(2), 459-469.

Alvarez, J. G., Touchstone, J. C., Blasco, L., & Storey, B. T. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of andrology*, **8**(5), 338-348.

Andrews, J. C., Nolan, J. P., Hammerstedt, R. H., & Bavister, B. D. 1994. Role of zinc during hamster sperm capacitation. *Biology of reproduction*, **51**(6), 1238-1247.

Andreychenko, S. V., Klepko, A. V., Gorban, L. V., Motryna, O. A., Grubska, L. V., & Trofimenko, O. V. 2016. Post-chornobyl remote radiation effects on human sperm and seminal plasma characteristics. *Experimental onkology*

Arnoult, C., Kazam, I. G., Visconti, P. E., Kopf, G. S., Villaz, M., & Florman, H. M. 1999. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**(12), 6757-6762.

Arnoult, C., Lemos, J. R., & Florman, H. M. 1997. Voltage-dependent modulation of T-type calcium channels by protein tyrosine phosphorylation. *The EMBO Journal*, **16**(7), 1593-1599.

Arnoult, C., Zeng, Y., & Florman, H. M. 1996. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *The Journal of cell biology*, **134**(3), 637-645.

BALDI, E., CASANO, R., FALSETTI, C., KRAUSZ, C., MAGGI, M., & FORTI, G. 1991. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *Journal of andrology*, **12**(5), 323-330.

- Barratt, C. L. R., Bolton, A. E., & Cooke, I. D. 1990. Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Human Reproduction*, **5**(6), 639-648.
- Baxendale, R. W., & Fraser, L. R. 2005. Mammalian sperm phosphodiesterases and their involvement in receptor-mediated cell signaling important for capacitation. *Molecular reproduction and development*, **71**(4), 495-508.
- Bedford, J. M. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*, (Suppl. 2), 128-158.
- Bielfeld, P., Jeyendran, R. S., & Zaneveld, L. J. 1991. Human spermatozoa do not undergo the acrosome reaction during storage in the cervix. *International journal of fertility*, **36**(5), 302-306.
- Bleil, J. D., & Wassarman, P. M. 1983. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Developmental biology*, **95**(2), 317-324.
- Burkman, L. J., Overstreet, J. W., & Katz, D. F. 1984. A possible role for potassium and pyruvate in the modulation of sperm motility in the rabbit oviducal isthmus. *Reproduction*, **71**(2), 367-376.
- Carlson, A. E., Quill, T. A., Westenbroek, R. E., Schuh, S. M., Hille, B., & Babcock, D. F. 2005. Identical phenotypes of CatSper1 and CatSper2 null sperm. *Journal of Biological Chemistry*.
- Clermont, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological reviews*, **52**(1), 198-236.
- Colagar, A. H., Marzony, E. T., & Chaichi, M. J. 2009. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutrition Research*, **29**(2), 82-88
- Conner, S. J., Lefievre, L., Hughes, D. C., & Barratt, C. L. R. 2005. Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida. *Human Reproduction*, **20**(5), 1148-1152.

- Cross, N. L. 1996. Effect of cholesterol and other sterols on human sperm acrosomal responsiveness. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, **45**(2), 212-217.
- Davis, B. K., Byrne, R., & Bedigian, K. 1980. Studies on the mechanism of capacitation: albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **77**(3), 1546-1550.
- De Franca, L. R., Ye, S. J., Ying, L., Sandberg, M., & Russell, L. D. 1995. Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. *The Anatomical Record*, **241**(2), 181-204.
- DE ROOIJ, D. G., & RUSSELL, L. D. 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of andrology*, **21**(6), 776-798.
- Doherty, C. M., Tarchala, S. M., Radwanska, E., & de Jonge, C. J. 1995. Characterization of two second messenger pathways and their interactions in eliciting the human sperm acrosome reaction. *Journal of andrology*, **16**(1), 36-46.
- Ehrenwald, E., Foote, R. H., & Parks, J. E. 1990. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Molecular reproduction and development*, **25**(2), 195-204.
- Elsej, D. J., Fowkes, R. C., & Baxter, G. F. 2010. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H₂S). *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, **28**(2), 95-106.
- Escoffier, J., Krapf, D., Navarrete, F., Darszon, A., & Visconti, P. E. 2012. Flow cytometry analysis reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation. *J Cell Sci*, jcs-093344.
- Fénichel, P., & Parinaud, J. (Eds.). 1995. *Human Sperm Acrosome Reaction* (Vol. 236). John Libbey EUROTEXT
- Florman, H. M., & Ducibella, T. 2006. Fertilization in mammals. In 'Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*'. 3rd edn.(Ed. JD Neill.) pp. 55–112.

- Florman, H. M., & Storey, B. T. 1982. Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Developmental biology*, **91**(1), 121-130.
- França, L. R., & Cardoso, F. M. 1998. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar. *Tissue and Cell*, **30**(5), 573-582.
- Furne, J., Springfield, J., Koenig, T., DeMaster, E., & Levitt, M. D. 2001. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochemical pharmacology*, **62**(2), 255-259.
- Fusi, F. M., & Bronson, R. A. 1992. Sperm surface fibronectin expression following capacitation. *Journal of andrology*, **13**(1), 28-35.
- Fusi, F. M., Lorenzetti, I., Vignali, M., & Bronson, R. A. 1992. Sperm surface proteins after capacitation: Expression of vitronectin on the spermatozoan head and laminin on the sperm tail. *Journal of andrology*, **13**(6), 488-497.
- Gadella, B. M., & Harrison, R. A. 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*, **127**(11), 2407-2420.
- Garbers, D. L., First, N. L., & Lardy, H. A. 1973. Properties of adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinases isolated from bovine epididymal spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*, **248**(3), 875-879.
- Garbers, D. L. 1989. Molecular basis of fertilization. *Annual review of biochemistry*, **58**(1), 719-742.
- Garbers, D., & Kopf, G. 1980. The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides. *The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides.*, 251-306.
- Grishin, N. V., Phillips, M. A., & Goldsmith, E. J. 1995. Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases. *Protein Science*, **4**(7), 1291-1304.
- Harrison, R. A. P. 2004. Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, **67**(3), 337-352.

- Henkel, R., Bittner, J., Weber, R., Hüther, F., & Miska, W. 1999. Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. *Fertility and sterility*, **71**(6), 1138-1143
- Hess, R. A. 1990. Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biology of reproduction*, **43**(3), 525-542.
- Hess, R. A., & de Franca, L. R. 2009. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In *Molecular mechanisms in spermatogenesis* (pp. 1-15). Springer, New York, NY.
- Hess, R. A., Miller, L. A., Kirby, J. D., Margoliash, E., & Goldberg, E. 1993. Immunoelectron microscopic localization of testicular and somatic cytochromes c in the seminiferous epithelium of the rat. *Biology of reproduction*, **48**(6), 1299-1308.
- Hunter, R. H. F. 1987. Human fertilization in vivo, with special reference to progression, storage and release of competent spermatozoa. *Human Reproduction*, **2**(4), 329-332.
- Hunter, R. H. F. 1981. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *Reproduction*, **63**(1), 109-117.
- Hunter, R. H. F., & Dziuk, P. J. 1968. Sperm penetration of pig eggs in relation to the timing of ovulation and insemination. *Reproduction*, **15**(2), 199-208.
- Hunter, R. H. F., & Nichol, R. 1986. A preovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *Reproduction*, **77**(2), 599-606.
- Hunter, R. H. F., & Rodriguez-Martinez, H. 2004. Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the Fallopian tubes. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, **67**(2), 243-250.
- Hyne, R. V., Higginson, R. E., Kohlman, D., & Lopata, A. 1984. Sodium requirement for capacitation and membrane fusion during the guinea-pig sperm acrosome reaction. *Journal of reproduction and fertility*, **70**(1), 83-94.

- Chakravarty, S., Bansal, P., Sutovsky, P., & Gupta, S. K. 2008. Role of proteasomal activity in the induction of acrosomal exocytosis in human spermatozoa. *Reproductive biomedicine online*, **16**(3), 391-400
- Chen, X., Jhee, K. H., & Kruger, W. D. 2004. Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine β -synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(50), 52082-52086.
- Iciek, M., & Wlodek, L. 2001. Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur. *Polish journal of pharmacology*, **53**(3), 215-226.
- Irani, M., Amirian, M., Sadeghi, R., Le Lez, J., & Roudsari, R. L. 2017. The Effect of Folate and Folate Plus Zinc Supplementation on Endocrine Parameters and Sperm Characteristics in Sub-Fertile Men: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Urology journal*, **14**(5), 4069-4078
- Ishii, I., Akahoshi, N., Xiao-Nian, Y. U., Kobayashi, Y., Namekata, K., Komaki, G., & Kimura, H. 2004. Murine cystathionine γ -lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochemical Journal*, **381**(1), 113-123.
- Jansen, R. P. S., & Bajpai, V. K. 1982. Oviduct acid mucus glycoproteins in the estrous rabbit: ultrastructure and histochemistry. *Biology of reproduction*, **26**(1), 155-168.
- Jhee, K. H., McPhie, P., & Miles, E. W. 2000. Domain architecture of the heme-independent yeast cystathionine β -synthase provides insights into mechanisms of catalysis and regulation. *Biochemistry*, **39**(34), 10548-10556.
- Kamoun, P. 2004. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino acids*, **26**(3), 243-254.
- Kerns, K., Zigo, M., & Sutovsky, P. 2018. Zinc: A Necessary Ion for Mammalian Sperm Fertilization Competency. *International journal of molecular sciences*, **19**(12), 4097

- Kery, V., Poneleit, L., & Kraus, J. P. 1998. Trypsin cleavage of human cystathionine β -synthase into an evolutionarily conserved active core: structural and functional consequences. *Archives of biochemistry and biophysics*, **355**(2), 222-232.
- Krapf, D., Arcelay, E., Wertheimer, E. V., Sanjay, A., Pilder, S. H., Salicioni, A. M., & Visconti, P. E. 2010. Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, **285**(11), 7977-7985.
- Kraus, J. P., Janošík, M., Kožich, V., Mandell, R., Shih, V., Sperandio, M. P., ... & Blom, H. 1999. Cystathionine β -synthase mutations in homocystinuria. *Human mutation*, **13**(5), 362-375.
- Krejčová, T., Smelcová, M., Petr, J., Bodart, JF, Sedmiková, M., Nevoral, J., ... & Chmelíková, E. 2015. Dárce sirovodíku chrání prasečí oocyty proti stárnutí a zlepšuje vývojový potenciál starých prasečích oocytů. *PloS jeden*, **10** (1), e0116964.
- Kumar, T. R., Wiseman, A. L., Kala, G., Kala, S. V., Matzuk, M. M., & Lieberman, M. W. 2000. Reproductive defects in γ -glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Endocrinology*, **141**(11), 4270-4277.
- Langlais, J., Kan, F. W. K., Granger, L., Raymond, L., Bleau, G., & Roberts, K. D. 1988. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete research*, **20**(2), 185-201.
- Langlais, J., Zollinger, M., Plante, L., Chapdelaine, A., Bleau, G., & Roberts, K. D. 1981. Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **78**(12), 7266-7270.
- Leblond, C. P., & Clermont, Y. 1952. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "periodic acid-fuchsin sulfurous acid" technique. *American Journal of Anatomy*, **90**(2), 167-215.
- Leclerc, P., de Lamirande, E., & Gagnon, C. 1996. Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biology of reproduction*, **55**(3), 684-692.

- Leclerc, P., De Lamirande, E., & Gagnon, C. 1997. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radical Biology and Medicine*, **22**(4), 643-656.
- Leitzmann, M. F., Stampfer, M. J., Wu, K., Colditz, G. A., Willett, W. C., & Giovannucci, E. L. 2003. Zinc supplement use and risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **95**(13), 1004-1007
- Levitt, M. D., Furne, J., Springfield, J., Suarez, F., & DeMaster, E. 1999. Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. *The Journal of clinical investigation*, **104**(8), 1107-1114.
- Li, G., Xie, Z. Z., Chua, J. M., Wong, P. C., & Bian, J. 2015. Hydrogen sulfide protects testicular germ cells against heat-induced injury. *Nitric Oxide*, **46**, 165-171.
- López-González, I., Jose, L., Santi, C. M., Florman, H. M., Felix, R., & Darszon, A. 2001. Calmodulin antagonists inhibit T-type Ca²⁺ currents in mouse spermatogenic cells and the zona pellucida-induced sperm acrosome reaction. *Developmental biology*, **236**(1), 210-219.
- Łowicka, E., and Bełtowski, J. 2007. Hydrogen sulfide (H₂S)-the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological reports: PR*, **59**(1), 4-24.
- Maas, D. H., Storey, B. T., & Mastroianni Jr, L. 1977. Hydrogen ion and carbon dioxide content of the oviductal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertility and sterility*, **28**(9), 981-985.
- Mahajan, S. K., Prasad, A. S., & McDonald, F. D. 1984. Sexual dysfunction in uremic male: improvement following oral zinc supplementation. In *Trace Elements in Renal Insufficiency*(Vol. 38, pp. 103-111). Karger Publishers
- Meister, A. 1953. Conversion of the α -keto analog cysteine to pyruvate and sulfur. In *Fed. Proc* (Vol. 12, p. 245).
- Miles, E. W., & Kraus, J. P. 2004. Cystathionine β -synthase: structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(29), 29871-29874.

Módis, K., Coletta, C., Erdélyi, K., Papapetropoulos, A., & Szabo, C. 2013. Intramitochondrial hydrogen sulfide production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase maintains mitochondrial electron flow and supports cellular bioenergetics. *The FASEB Journal*, **27**(2), 601-611.

Mudd, S. H., Levy, H. L., & Kraus, J. P. 2001. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Scriver, CR, 2007-2056.

MUKHERJEE, S. B., Aravinda, S., Gopalakrishnan, B., Nagpal, S., SALUNKE, D. M., & Shaha, C. 1999. Secretion of glutathione S-transferase isoforms in the seminiferous tubular fluid, tissue distribution and sex steroid binding by rat GSTM1. *Biochemical Journal*, **340**(1), 309-320.

MURAD, C., de LAMIRANDE, E. V. E., & GAGNON, C. 1992. Hyperactivated motility is coupled with interdependent modifications at axonemal and cytosolic levels in human spermatozoa. *Journal of andrology*, **13**(4), 323-331.

Nagahara, N., Ito, T., Kitamura, H., & Nishino, T. 1998. Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. *Histochemistry and cell biology*, **110**(3), 243-250

Nagahara, N., Ito, T., & Minami, M. 1999. Invited Reviews-Mercaptopyruvate sulfurtransferase as a defense against cyanide toxication: Molecular properties and mode of detoxification. *Histology and histopathology*, **14**(4), 1277-1286.

Nagahara, N., Okazaki, T., & Nishino, T. 1995. Cytosolic mercaptopyruvate sulfurtransferase is evolutionarily related to mitochondrial rhodanese. Striking similarity in active site amino acid sequence and the increase in the mercaptopyruvate sulfurtransferase activity of rhodanese by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, **270**(27), 16230-16235.

Nagahara, N., & Nishino, T. 1996. Role of Amino Acid Residues in the Active Site of Rat Liver Mercaptopyruvate Sulfurtransferase cDNA CLONING, OVEREXPRESSION, AND SITE-DIRECTED MUTAGENESIS. *Journal of Biological Chemistry*, **271**(44), 27395-27401.

- Narasimhaiah, M., Arunachalam, A., Sellappan, S., Mayasula, V. K., Guvvala, P. R., Ghosh, S. K., ... & Kumar, H. 2018. Organic zinc and copper supplementation on antioxidant protective mechanism and their correlation with sperm functional characteristics in goats. *Reproduction in Domestic Animals*, **53**(3), 644-654
- Navarrete, F. A., García-Vázquez, F. A., Alvau, A., Escoffier, J., Krapf, D., Sánchez-Cárdenas, C., ... & Visconti, P. E. 2015. Biphasic role of calcium in mouse sperm capacitation signaling pathways. *Journal of cellular physiology*, **230**(8), 1758-1769.
- Nevoral, J., Žalmanová, T., Zámostná, K., Kott, T., Kučerová-Chrpová, V., Bodart, J. F., ... and Klein, P. 2015. Endogenously produced hydrogen sulfide is involved in porcine oocyte maturation in vitro. *Nitric Oxide*, **51**, 24-35.
- Ning, N., Zhu, J., Du, Y., Gao, X., Liu, C., & Li, J. 2014. Dysregulation of hydrogen sulphide metabolism impairs oviductal transport of embryos. *Nature communications*, **5**, 4107.
- 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. *The Journal of nutrition*, **131**(8), 2150-2156.
- Okamura, N., Tajima, Y., Ishikawa, H., Yoshii, S., Koiso, K., & Sugita, Y. 1986. Lowered levels of bicarbonate in seminal plasma cause the poor sperm motility in human infertile patients. *Fertility and sterility*, **45**(2), 265-272.
- Okamura, N., Tajima, Y., Soejima, A., Masuda, H., & Sugita, Y. 1985. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, **260**(17), 9699-9705.
- Osman, R. A., Andria, M. L., Jones, A. D., & Meizel, S. 1989. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochemical and biophysical research communications*, **160**(2), 828-833.
- Patel, P., Vatish, M., Heptinstall, J., Wang, R., & Carson, R. J. 2009. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **7**(1), 10.

- Perey, B., Clermont, Y., & Leblond, C. P. 1961. The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *American Journal of Anatomy*, **108**(1), 47-77.
- Picton, R., Eggo, M. C., Merrill, G. A., Langman, M. J. S., & Singh, S. 2002. Mucosal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese. *Gut*, **50**(2), 201-205.
- Plum, L. M., Rink, L., & Haase, H. 2010. The essential toxin: impact of zinc on human health. *International journal of environmental research and public health*, **7**(4), 1342-1365
- Prasad, A. S., Mantzoros, C. S., Beck, F. W., Hess, J. W., & Brewer, G. J. 1996. Zinc status and serum testosterone levels of healthy adults. *Nutrition*, **12**(5), 344-348
- Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., ... & Clapham, D. E. 2007. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**(4), 1219-1223.
- Qiao-li, Z., & Jun-bao, D. U. 1986. Study Progress of Gasotransmitter Hydrogen Sulfide and Cardiovascular Diseases. *Journal of Applied Clinical Pediatrics*, (01).
- Rodriguez-Martinez, H. 2007. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*, **68**, S138-S146.
- Rodriguez-Martinez, H., Tienthai, P., Suzuki, K., Funahashi, H., Ekwall, H., & Johannisson, A. 2001. Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-SUPPLEMENT-*, 129-145.
- Roldan, E. R., Murase, T., & Shi, Q. X. 1994. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science*, **266**(5190), 1578-1581.
- Ruknudin, A., & Silver, I. A. 1990. Ca²⁺ uptake during capacitation of mouse spermatozoa and the effect of an anion transport inhibitor on Ca²⁺ uptake. *Molecular reproduction and development*, **26**(1), 63-68.
- Russell, L. 1977. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *American Journal of Anatomy*, **148**(3), 313-328.

- Russell, L. D. 1990. Staging for laboratory species. *Histological and histopathological evaluation of the testis*, 62-194.
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P. S., & Clegg, E. D. 1993. Histological and histopathological evaluation of the testis. *International journal of andrology*, **16**(1), 83-83.
- Sanchez, R., Deppe, M., Schulz, M., Bravo, P., Villegas, J., Morales, P., & Risopatron, J. 2011. Participation of the sperm proteasome during in vitro fertilisation and the acrosome reaction in cattle. *Andrologia*, **43**(2), 114-120
- Searcy, D. G. 1996. HS⁻: O₂oxidoreductase activity of Cu, Zn superoxide dismutase. *Archives of biochemistry and biophysics*, **334**(1), 50-58.
- Selhub, J. 1999. Homocysteine metabolism. *Annual review of nutrition*, **19**(1), 217-246.
- SHUBHADA, S., DAVER, R., & TSAI, Y. H. 1989. The changing profiles of L-ornithine decarboxylase and S-adenosyl-L-methionine decarboxylase activities in testicular cell types during sexual maturation of male rats. *Journal of andrology*, **10**(2), 152-158.
- Smith, T.T., & Nothnick, W. B. 1997. Role of direct contact between spermatozoa and oviductal epithelial cells in maintaining rabbit sperm viability. *Biology of reproduction*, **56**(1), 83-89.
- Spallarossa, A., Forlani, F., Carpen, A., Armirotti, A., Pagani, S., Bolognesi, M., & Bordo, D. 2004. The “rhodanese” fold and catalytic mechanism of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferases: crystal structure of SseA from *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, **335**(2), 583-593.
- Srilatha, B., Adaikan, P. G., & Moore, P. K. 2006. Possible role for the novel gasotransmitter hydrogen sulphide in erectile dysfunction—a pilot study. *European journal of pharmacology*, **535**(1-3), 280-282.
- Srilatha, B., Hu, L., Adaikan, G. P., & Moore, P. K. 2009. BASIC SCIENCE: Initial Characterization of Hydrogen Sulfide Effects in Female Sexual Function. *The journal of sexual medicine*, **6**(7), 1875-1884.
- Stipanuk, M. H. 2004. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu. Rev. Nutr.*, **24**, 539-577.

- Suarez, S. S., & Dai, X. 1992. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biology of reproduction*, **46**(4), 686-691.
- Suarez, S. S., Katz, D. F., Owen, D. H., Andrew, J. B., & Powell, R. L. 1991. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biology of reproduction*, **44**(2), 375-381.
- Sugiura, Y., Kashiba, M., Maruyama, K., Hoshikawa, K., Sasaki, R., Saito, K., ... & Suematsu, M. 2005. Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. *Antioxidants & redox signaling*, **7**(5-6), 781-787.
- Sutton, K. A., Jungnickel, M. K., Wang, Y., Cullen, K., Lambert, S., & Florman, H. M. 2004. Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm. *Developmental biology*, **274**(2), 426-435.
- Swaroop, M., Bradley, K., Ohura, T., Tahara, T., Roper, M. D., Rosenberg, L. E., & Kraus, J. P. 1992. Rat cystathionine beta-synthase. Gene organization and alternative splicing. *Journal of Biological Chemistry*, **267**(16), 11455-11461.
- Tash, J. S., Krinks, M., Patel, J., Means, R. L., Klee, C. B., & Means, A. R. 1988. Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *The Journal of cell biology*, **106**(5), 1625-1633.
- Tash, J. S. 1990. Role of cAMP, calcium, and protein phosphorylation in sperm motility. *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects* (ed. Gagnon, C.). CRC Press, Boca Raton, 229-240.
- 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*, **110**(31), 12679-12684.
- Thaler, C. D., & Cardullo, R. A. 1996. The initial molecular interaction between mouse sperm and the zona pellucida is a complex binding event. *Journal of Biological Chemistry*, **271**(38), 23289-23297.
- Underwood, E. J., & Somers, M. 1969. Studies of zinc nutrition in sheep. I. The relation of zinc to growth, testicular development, and spermatogenesis in young rams. *Australian Journal of Agricultural Research*, **20**(5), 889-897

- Visconti, P. E. 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(3), 667-668.
- Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P., & Kopf, G. S. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, **121**(4), 1129-1137.
- Wallace, J. L. 2010. Physiological and pathophysiological roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract. *Antioxidants & redox signaling*, **12**(9), 1125-1133.
- Wang, R. 2003. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxidants and Redox Signaling*, **5**(4), 493-501.
- Wang, J., Wang, W., Li, S., Han, Y., Zhang, P., Meng, G., ... & Chen, Q. 2018. Hydrogen Sulfide As a Potential Target in Preventing Spermatogenic Failure and Testicular Dysfunction. *Antioxidants & redox signaling*, **28**(16), 1447-1462.
- Wasco, W. M., Kincaid, R. L., & Orr, G. A. 1989. Identification and characterization of calmodulin-binding proteins in mammalian sperm flagella. *Journal of Biological Chemistry*, **264**(9), 5104-5111.
- Wennemuth, G., Carlson, A. E., Harper, A. J., & Babcock, D. F. 2003. Bicarbonate actions on flagellar and Ca²⁺-channel responses: initial events in sperm activation. *Development*, **130**(7), 1317-1326.
- Wolf, D. E., Hagopian, S. S., & Ishijima, S. 1986. Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse. *The Journal of cell biology*, **102**(4), 1372-1377.
- Wood, J. L., & Fiedler, H. 1953. β -Mercaptopyruvate, a substrate for rhodanese. *Journal of Biological Chemistry*, **205**(1), 231-234.
- Wroblewski, N., Schill, W. B., & Henkel, R. 2003. Metal chelators change the human sperm motility pattern. *Fertility and sterility*, **79**, 1584-1589
- Wu, J. Y., & Means, A. R. 2000. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV is expressed in spermatids and targeted to chromatin and the nuclear matrix. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(11), 7994-7999.

- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In 'The physiology of reproduction'.(Eds E. Knobil and JD Neill.) pp. 189–317.
- Yokota, N., & Sawada, H. 2007. Sperm proteasomes are responsible for the acrosome reaction and sperm penetration of the vitelline envelope during fertilization of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Developmental biology*, **308**(1), 222-231
- Zeng, Y., Clark, E. N., & Florman, H. M. 1995. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Developmental biology*, **171**(2), 554-563.
- Zeng, Y., Oberdorf, J. A., & Florman, H. M. 1996. pH regulation in mouse sperm: Identification of Na⁺-, Cl⁻-, and [formula] dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Developmental biology*, **173**(2), 510-520.
- Zinaman, M., Drobnis, E. Z., Morales, P., Brazil, C., Kiel, M., Cross, N. L., ... & Overstreet, J. W. 1989. The physiology of sperm recovered from the human cervix: acrosomal status and response to inducers of the acrosome reaction. *Biology of reproduction*, **41**(5), 790-797.
- Zhao, Y., Zhang, W. D., Liu, X. Q., Zhang, P. F., Hao, Y. N., Li, L., ... & Meng, Q. S. (2016). Hydrogen sulfide and/or ammonia reduces spermatozoa motility through AMPK/AKT related pathways. *Scientific reports*, **6**, 37884.
- Zhu, J. J., Barratt, C. L. R., & Cooke, I. D. 1992. Effect of human cervical mucus on human sperm motion and hyperactivation in vitro. *Human Reproduction*, **7**(10), 1402-1406.
- Zhu, J., Barratt, C. L., Lippes, J., Pacey, A. A., & Cooke, I. D. (1994). The sequential effects of human cervical mucus, oviductal fluid, and follicular fluid on sperm function. *Fertility and sterility*, **61**(6), 1129-1135.
- Zhu, W., Lin, A., & Banerjee, R. 2008. Kinetic properties of polymorphic variants and pathogenic mutants in human cystathionine γ -lyase. *Biochemistry*, **47**(23), 6226-6232.

9 Seznam příloh

Obrázek 1 Spermatogeneze, dostupné z: https://byjus.com/biology/spermatogenesis/	6
Obrázek 2 Struktura domény lidského CBS (Zdroj: Miles and Kraus 2004)	15
Obrázek 3 Metabolismus cysteinu (Łowicka, and Bełtowski (2007)).....	18
Obrázek 4 Metabolismus L-cysteinu a H ₂ S (zdroj: Elsey et al. 2010).	19
Obrázek 5 Katabolismus sulfanu (Łowicka, and Bełtowski (2007)	20
Obrázek 6 Imunodetekce pomocí protilátky anti- CSE	26
Obrázek 7 Imunodetekce pomocí protilátky anti -CBS	27
Obrázek 8 Imunodetekce pomocí protilátky anti -MPST	28
Obrázek 9 Imunocytochemická detekce CSE ve spermích kance	30
Obrázek 10 Intenzita signálu spermie kance: exprese CBS	32
Obrázek 11 Intenzita signálu spermie kance: exprese MPST ve spermích kance.....	34
Graf 1 Množství proteinu detekováno pomocí protilátky anti-CSE	27
Graf 2 Množství proteinu detekováno pomocí protilátky anti-CBS	28
Graf 3 Množství proteinu detekováno pomocí protilátky anti-MPST	29
Graf 4 Intenzita signálu u spermii kance: relativní intenzita CSE.....	31
Graf 5 Intenzita signálu u spermii kance: relativní intenzita CBS	33
Graf 6 Intenzita signálu u spermii kance: relativní intenzita MPST.....	35
Tabulka 1 Složení kapacitačního média TL-HEPES-PVA.....	22
Tabulka 2 Složení 12 % separačního gelu pro WesternBlot	23
Tabulka 3 Složení 15 % separačního gelu pro WesternBlot	23
Tabulka 4 Složení 4 % zaostřovacího gelu pro WesternBlot	23