

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Sulfan produkující enzymy v kančích spermích

Bakalářská práce

Zuzana Pilsová

Zoorehabilitace a asistenční aktivity se zvířaty

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

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph. D. za odborné vedení bakalářské práce a za veškeré cenné rady a metodické vedení při práci v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Petře Zelinkové, jež se zasloužila o přípravu vzorků pro moji experimentální část, ale také dalším kolegyním, které v rámci výzkumu zaměřeném na sulfan v reprodukci na Katedře veterinárních disciplín na České zemědělské univerzitě v Praze přispěly se zajímavými výsledky. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat sestře Anetě Pilsové, která se spolupodílela na experimentech, jenž jsou pro tuto práci stěžejní, a která mi pomáhala řešit různá úskalí v mé bakalářské práci. Nakonec bych chtěla poděkovat i mé rodině za podporu, kterou mi po celou dobu poskytovala.

Sulfan produkující enzymy v kančích spermích

Souhrn

Nedávné studie prokázaly, že kromě oxidu dusnatého a oxidu uhelnatého se mezi gasotransmitery v savčích tkáních může řadit také sulfan (H_2S). Tato signální molekula je v organismu endogenně produkována v nejrůznějších buňkách a tkáních enzymy cystathionin- β -syntázou, cystathionin- γ -lyázou, 3-mercaptopyruvát sulfurtransferázou a cystein aminotransferázou. H_2S reguluje celé spektrum fyziologických procesů a hraje důležitou roli při vzniku některých onemocnění, jako je například diabetes mellitus nebo srdeční selhání. Bylo zjištěno, že se H_2S uplatňuje jako signální molekula i spermích laboratorních hlodavců. Z tohoto důvodu byla vyslovena hypotéza, že v kančích spermích bude exprimován sulfan produkující enzym cystathionin- γ -lyáza. Cílem této práce bylo shrnout současné poznatky o enzymech produkujících sulfan, funkci H_2S v různých tkání a prokázat imunocytochemickou metodou přítomnost enzymu cystathionin- γ -lyázy v kančích spermích. Přítomnost enzymu byla v kančích spermích prokázána u ejakulovaných i kapacitovaných spermích.

Klíčová slova

- spermie
- cystathionin- γ -lyáza
- sulfan
- reprodukce

Sulphan-producing Enzymes in Boar Sperm

Summary

Recent studies have proved that not only nitric oxide and carbon monoxide, but also hydrogen sulphide (H₂S) belongs to gasotransmitters. This signalling molecule is endogenously produced in an organism in various cells and tissues by enzymes cystathionine-β-synthase, cystathionine-γ-lyase, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and cysteine aminotransferase. H₂S regulates the entire spectrum of physiological processes, and plays a significant role in some diseases, such as diabetes mellitus or heart failure. It has been found, that the hydrogen sulphide is used as a signalling molecule in sperm of laboratory rodents. Due to this fact, there is a hypothesis, that the sulphan producing enzyme cystathionin-γ-lyase is expressed in boar spermatozoa. The aim of this work was to summarize current knowledge about sulphan-producing enzymes, about the function of H₂S in various tissues, and to prove the presence of the enzyme cystathionine-γ-lyase in boar sperm by immunocytochemistry. The presence of the enzyme was proved in both ejaculated and capacitated boar sperm.

Keywords

- sperm
- cystathionine-γ-lyase
- sulphan
- reproduction

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce	2
3 Literární přehled.....	3
3.1 Samčí reprodukční systém	3
3.1.1 Spermatogeneze.....	3
3.1.2 Hormonální regulace	4
3.1.3 Morfologie spermie	6
3.1.4 Kapacitace.....	9
3.1.5 Akrozomální reakce	10
3.2 Sulfan.....	12
3.2.1 Vlastnosti sulfanu	12
3.2.2 Produkce a metabolismus sulfanu v organismu.....	14
3.2.3 Sulfan produkující enzymy, CTH	16
3.2.4 Funkce sulfanu v organismu	17
3.2.5 Funkce sulfanu v reprodukci.....	20
3.3 Imunocytochemie.....	24
4 Materiál a metody.....	25
4.1 Použité protilátky	25
4.2 Příprava vzorků.....	26
4.3 Imunocytochemické stanovení CTH.....	28
4.4 Statistická analýza	28
5 Výsledky	29
6 Diskuze	36

7 Závěr.....	38
8 Seznam použité literatury	39

1 Úvod

Tato bakalářská práce byla zacílena na problematiku sulfanu jakožto plynné signální molekuly, jež v organismu reguluje celou řadu fyziologických procesů. Práce je rozdělena na část teoretickou a praktickou, která má experimentální charakter.

V teoretické části bylo hlavním tématem popsání principu spermatogeneze. Tento složitý proces je regulován řadou hormonů a po úspěšném dokončení vznikne zralá spermie. Samčí gameta obsahuje nejrůznější organely a některé z těchto organel se podílí na procesu kapacitace a akrozomální reakci, což jsou děje potřebné ke splnutí spermie a oocyty.

Dále byla práce cílena na shrnutí poznatků o sulfanu (H_2S). Ještě před několika lety byl sulfan považován za velmi toxický, nicméně bylo zjištěno, že tento plyn je endogenně tvořen v buňkách a slouží jako signální molekula. Zařadil se tak do skupiny plynů, které v buňkách přenášejí signál, tzv. gasotransmiterů. V savčích tkáních je sulfan produkován pomocí enzymů. Mezi tyto enzymy patří cystathionin- β -syntáza (CBS), cystathionin- γ -lyáza (CTH), 3-mercaptopyruvát sulfurtransferáza (3-MST) a cystein aminotransferáza (CAT) (Kimura et al. 2012).

V posledních letech byla provedena celá řada experimentů, které prokázaly, že sulfan má v organismu mnoho důležitých funkcí. Již se ví, že má svoji roli v nervovém systému, a tudíž by mohl ovlivnit průběh neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba. V kardiovaskulárním systému zabraňuje vzniku aterosklerózy, snižuje krevní tlak, podporuje angiogenezi a chrání srdce před infarktem, zatímco v gastrointestinálním traktu se podílí na udržování homeostázy (Wang 2010). Také chrání před ischemicko-reperfúzním poškozením ledvin a jater (Calvert et al. 2010). Sulfan se vyskytuje mimo jiné i v reprodukčním traktu a plní tu mnoho důležitých funkcí, například u samců napomáhá erekci penisu. U samic se sulfan v hojné míře vyskytuje v placentě, dále v děloze, plodových obalech, ale i v samotných oocytech (Srilatha et al. 2009). Funkce sulfanu v oblasti reprodukce se ještě stále intenzivně zkoumá a je téměř jisté, že mnoho jeho rolí dosud nebylo odkryto.

Experimentální část práce byla zaměřena na důkaz sulfan produkujícího enzymu cystathionin- γ -lyázy (CTH) v kančích spermii pomocí imunocytochemické metody.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo shrnout současné poznatky o enzymech, které jsou v buňkách zodpovědné za produkci gasotransmiteru sulfanu. Dále pojednat o funkci sulfanu při řízení reprodukčních procesů. Cílem experimentální části práce bylo potvrdit hypotézu, že v kančích spermiích je exprimována cystathionin- γ -lyáza (CTH) jako jeden z enzymů, které sulfan produkují.

3 Literární přehled

3.1 Samčí reprodukční systém

Samčí reprodukční systém zajišťuje tvorbu samčích pohlavních buněk - spermii, a jejich následný transport do samičích pohlavních cest. Spermie vznikají procesem zvaným spermatogeneze v semenotvorných kanálcích varlat, načež přechází do nadvarlete, kde dozrávají.

3.1.1 Spermatogeneze

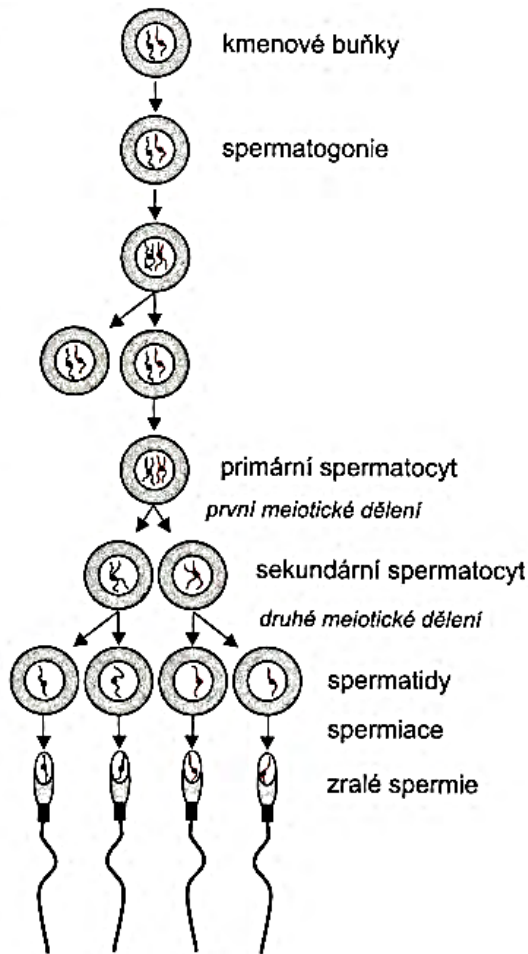
Spermatogeneze je proces zahrnující mitózu a meiózu (viz Obr. č. 1). Mitózou se rozumí dělení buněk, při kterém má nově vzniklá buňka vždy $2n$ chromozomů, je tedy diploidní. Naproti tomu meióza je dělení, při kterém má nová buňky pouze poloviční sadu chromozomů ($1n$), a proto se nazývá haploidní (Reece 1998).

Mitóza začíná rozdělením spermatogonií ($2n$) na dvě dceřiné buňky spermatogonie. Tento proces se nazývá spermatocytogeneze. Jedna ze spermatogonií zůstává v bazální části kanálu, avšak ta druhá (spermatogonie typu A) prodělá mitotické dělení, které může zahrnovat až několik generací buněk. Takto vznikne spermatogonie typu B, která se poté mitoticky dělí za vzniku primárního spermatocyty, který má diploidní počet chromozomů (Kittnar 2011).

Primární spermatocyt se poté meioticky dělí, meióza se však pozastaví v profázi 1, protože k dokončení meiózy je třeba zvýšená produkce testosteronu, k čemuž dojde v období puberty. Následně se první meiotické dělení dokončí a z primárního spermatocyty vzniknou sekundární spermatocyty. Dále dojde k druhému meiotickému dělení a tím vzniknou spermatidy ($1n$) (Kittnar 2011).

Dalším krokem je spermiogeneze, která zahrnuje změny v jádru a cytoplazmě, transformaci nepohyblivých buněk na potenciálně pohyblivé a to díky bičíku, jenž se u nich vytvořil (De Kretser et al. 1998). Poté, co spermatidy dozrají, uvolní se do lumen semenotvorného kanálku jako spermie. Tyto spermie jsou stále nepohyblivé, proto jsou do nadvarlete transportovány pomocí tekutiny, která se secernuje v semenotvorných kanálcích, a pomocí kontraktilních elementů ve varleti (Reece 1998).

V nadvarleti spermie dozrávají. Jsou schopné oplození a také získávají schopnost pohybu dopředu. Také nastanou změny na jaderném chromatinu a na struktuře plazmatické membrány, která je obohacena o cholesterol a některé proteiny. Upravuje se tvar a obsah akrozomu. Dokud nedojde k uvolnění, spermie zde zůstávají a shromažďují se v ocasu nadvarlete. Reece (1998) uvádí, že u kanců je denně produkováno až $16,5 \times 10^9$ spermií.



Obrázek č. 1 - Schématické zobrazení fází spermatogeneze u samců. U každé etapy je vyznačen počet chromozomů, též je znázorněn moment, kdy dojde k jednotlivým meiotickým dělením (Kittnar 2011).

3.1.2 Hormonální regulace

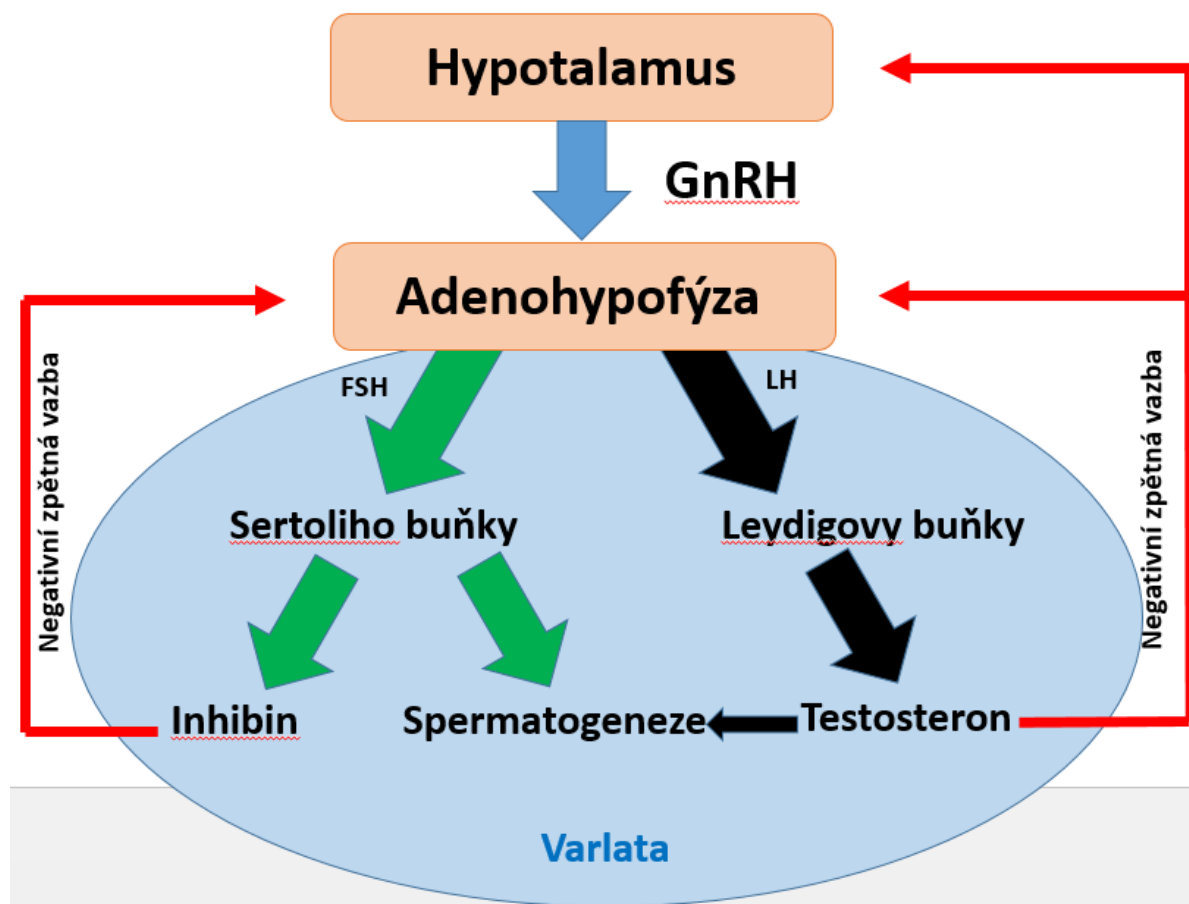
Savčí spermatogeneze vyžaduje působení několika hormonů. Každý z nich je velmi důležitý pro normální fungování samčího reprodukčního systému. Avšak tyto hormony nejsou potřebné pouze k regulaci vývoje samčích zárodečných buněk, ale také pro tvorbu nových

somatických buněk, které jsou potřebné pro správný vývoj varlat (Sharpe 1994; McLachlan et al. 2002). Mezi tyto buňky patří Leydigovy buňky, jejichž primární funkcí je produkce testosteronu (Mendis-Handagama 1997), a Sertoliho buňky, které poskytují ochranu a výživu vyvíjejícím se spermii (Reece 1998).

Celý proces steroidogeneze řídí gonadotropin stimulující hormon (GnRH), který je tvořen v hypotalamu a dále uvolňován portálním venózním systémem do hypofýzy. Jeho sekrece je regulována negativní zpětnou vazbou mezi gonadotropiny a hypotalamem (Kittnar 2011). Mezi další hormony, které ovlivňují samčí reprodukci, se řadí luteinizační hormon (LH), folikulostimulační hormon (FSH) a testosteron (viz Obr. č. 2).

Luteinizační hormon (LH) je jedním z hormonů předního laloku hypofýzy (adenohypofýza) a řídí produkci testosteronu tím, že působí na Leydigovy buňky. K regulaci testosteronu pomocí LH dochází na principu negativní zpětné vazby (Reece 1998). Folikulostimulační hormon (FSH) je rovněž hormonem adenohypofýzy. Receptor tohoto hormonu se nachází v Sertoliho buňkách ve varleti. Některé studie u hlodavců prokázaly, že primární rolí FSH ve spermatogenezi je stimulace proliferace Sertoliho buněk během prepubertálního vývoje (Heckert & Griswold 2002). Sharpe (1994) se domnívá, že počet Sertoliho buněk do značné míry určuje počet zárodečných buněk. FSH stimuluje produkci proteinu vázajícího androgeny (ABP) v Sertoliho buňkách, který je následně secernován do lumen semenotvorného kanálku a váže testosteron a další androgeny. Díky tomu stabilizuje jejich koncentrace a zajišťuje přiměřené množství pro spermatogenezi. Další funkcí FSH je pravděpodobně stimulace sekrece estrogenu Sertoliho buňkami, což může zvyšovat intracelulární přeměnu testosteronu, jenž pochází z Leydigových buněk. Na inhibici FSH se podílí hormon inhibin, jenž je taktéž produkován Sertoliho buňkami (Reece 1998).

Testosteron je steroidní hormon ze skupiny androgenů, vzniká v Leydigových buňkách ve varlatech a v buňkách nadledvinek. Testosteron u samců zajišťuje spermatogenní aktivitu, ale i další funkce, jako je například vznik a udržení libida, sekreční aktivita přídatných pohlavních žláz a rozvoj sekundárních pohlavních znaků, s čímž souvisí i anabolické působení (Reece 1998). Testosteron mimo jiné prenatálně stimuluje diferenciaci a růst samčího reprodukčního systému a sestup varlat do šourku (Kittnar 2011). Jak již bylo zmíněno, testosteron je také nezbytný pro zahájení spermatogeneze v období puberty.

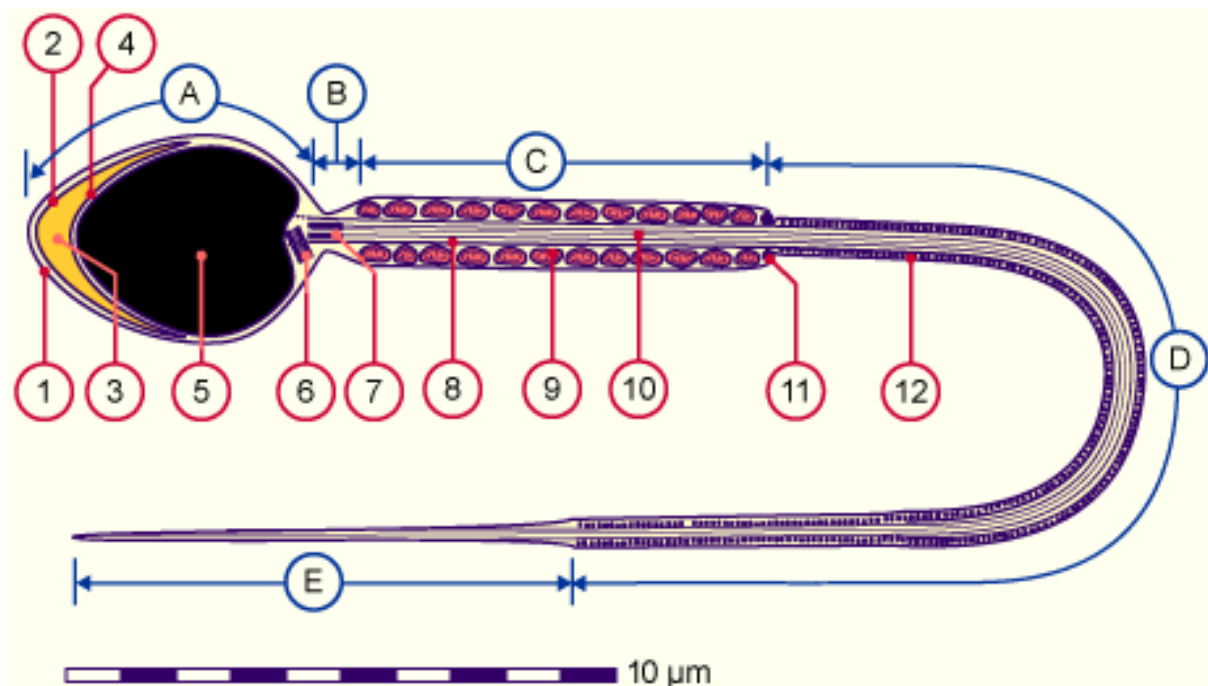


Obrázek č. 2 - Hormonální regulace spermatogeneze. Schéma zobrazuje hypotalamo-hypofyzární osu a vztah mezi jednotlivými hormony. Je zde patrné ovlivňování sekrece hormonů na principu negativní zpětné vazby (Reece 1998).

3.1.3 Morfologie spermie

Spermie je specializovaná pohlavní buňka (samčí gameta), která se podstatně liší od ostatních tělních buněk. Je schopna konat aktivní pohyb a její hlavní funkcí je oplodnění samičí pohlavní buňky - oocytu.

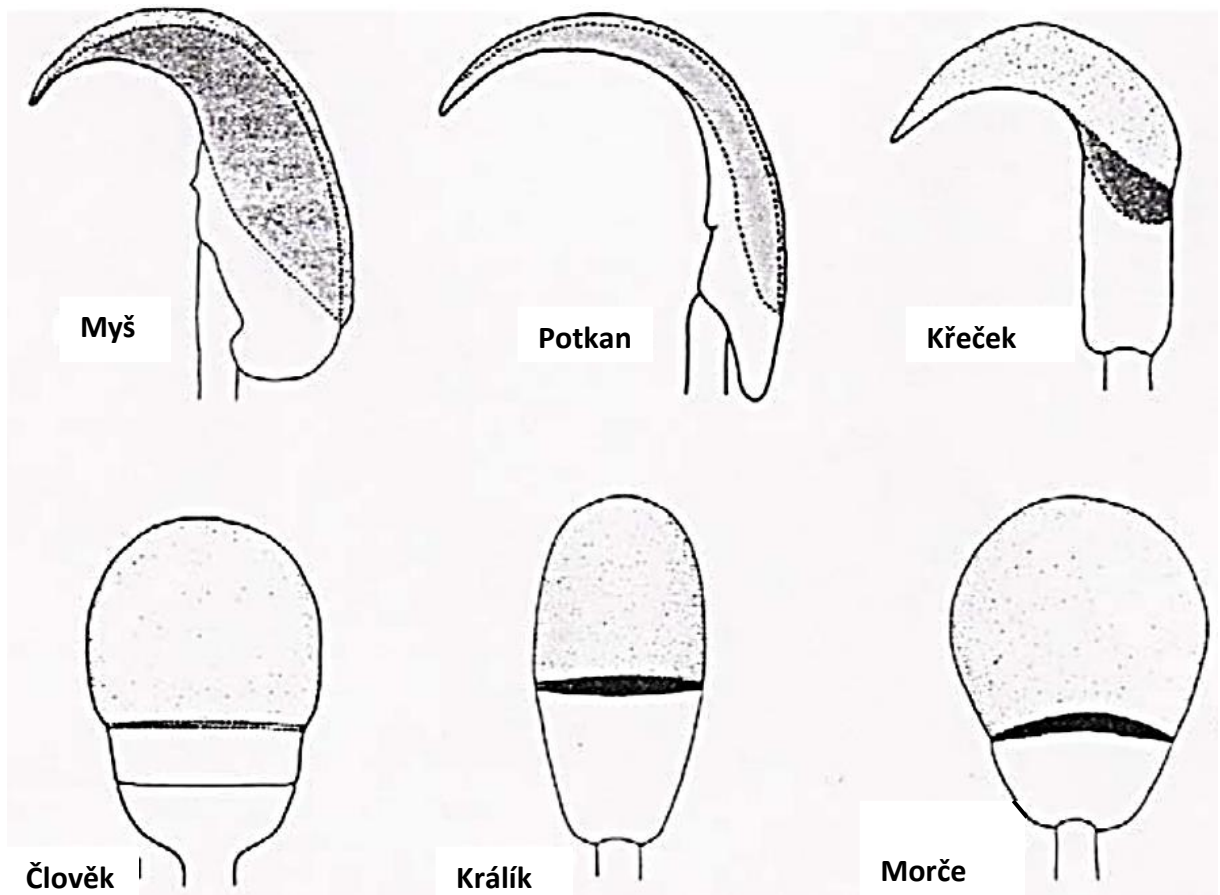
Po dokončení vývoje je zralá spermie vybavena hlavičkou, krčkem a ocasem (Reece 1998) (viz Obr. č. 3). Hlavička je dlouhá asi 5–10 nm (Jelínek & Koudela 2003). Tvar hlavičky se u jednotlivých druhů savců velmi liší. Eddy & O'Brien (1994) rozlišují čtyři základní morfologické typy hlaviček - oválné, které se nacházejí například u kance, kulaté, s nimiž se můžeme setkat u člověka, dále háčkovité neboli falciformní, jež jsou typické pro myš a nakonec hlavičky s velkým akrozómem, které jsou typické například pro veverku (viz Obr. č. 4).



Obrázek č. 3 - Stavba a hlavní komponenty spermie. A - hlavička, B - krček, C - střední část, D - hlavní část, E - koncová část, 1 - plazmatická membrána, 2 - vnější akrozomální membrána, 3 - akrozóm, 4 - vnitřní akrozomální membrána, 5 - jádro, 6 - proximální centriola, 7 - zbytek distální centrioly, 8 - vnější fibrózní vlákna, 9 - mitochondrie, 10 - axonema, 11 - terminální disk, 12 - prstencová vlákna (Schöni-Affolter et al. 2005).

Rozdílný tvar hlavičky je dán jádrem spermie. Uvnitř hlavičky se totiž nachází právě jádro a akrozom, které zaujímají většinu prostoru. Jsou obklopeny malým množstvím cytoplazmy a cytoskeletálních částic. Jádro má haploidní sadu chromozomů (1n) a je obklopeno jadernou membránou. Samotný akrozom je situován v přední části hlavičky. Je to specifická organela spermii, která obsahuje hydrolytické enzymy a mukopolysacharidy, jenž jsou schopny rozštěpit zonu pellucidu oocyty, tedy jeho glykoproteinový obal, díky čemuž je spermii umožněno tímto obalem proniknout. Akrozom je dvouvrstevný a mezi membránami se nachází akrozomální váček, který obsahuje již zmíněné enzymy. V zadní části hlavičky je situovaná cytoplazmatická membrána a postakrozomální čapka. Celá hlavička je pokryta plazmatickou membránou, která přechází v bičík.

Krček, neboli spojovací část, zajišťuje spojení mezi hlavičkou a bičíkem spermie. Součástí krčku jsou dvě za sebou uspořádané centrioly - proximální a distální, přičemž z proximální centrioly je tvořena hlavice bičíku (Gamčík et al. 1976).



Obrázek č. 4 - Morfologické typy hlavičky spermie u různých druhů zvířat a u člověka. Typ háčkovité neboli falciformní hlavičky je možný pozorovat u různých hlodavců, naopak kulatý typ je přítomný například u člověka, králíka nebo morčete (Eddy & O'Brien 1994).

Bičík je vybaven mitochondriálním aparátem, který tvoří energii ve formě ATP. Tato molekula umožňuje spermii se pohybovat a dostat se tak na místo oplození. Na vlastním pohybu se podílí axiální vlákna, která jsou schopna vytvořenou energii přeměnit na mechanickou (Gamčík et al. 1976).

Bičík se skládá ze tří částí - střední, hlavní a koncové. Střední část, nebo též mitochondriální část, je charakterizována velkým počtem mitochondrií, které jsou přemístěné do mitochondriální pochvy, jež obklopuje bičík. Zde jsou mitochondrie spirálovitě seskupené (Jelínek & Koudela 2003). Další strukturou středního oddílu spermie je axonema. Ta je tvořena komplexem mikrotubul a osových vláken (Stenesh 1989). Úkolem této části bičíku je organizace pohybu (Porter & Sale 2000). Na povrchu bičíku se nachází fibrózní pochva, která slouží jako výztuha bičíku. Díky fibrózní pochvě je také umožněna velká elasticita bičíku. (Jelínek & Koudela 2003)

Hlavní část bičíku je stavbou podobná střední části. Její podklad tvoří osově vlákno obalené fibrózní pochvou. Oproti střední části neobsahuje mitochondriální pochvu. Hlavní oddíl je nejdelší částí bičíku a měří asi 40–50 nm (Jelínek & Koudela 2003).

Koncová část je tvořena centrálním párem mikrotubulů, které jsou obaleny plazmatickou membránou. Chybí zde fibrózní pochva, jež je součástí obou předchozích oddílů (Jelínek & Koudela 2003).

3.1.4 Kapacitace

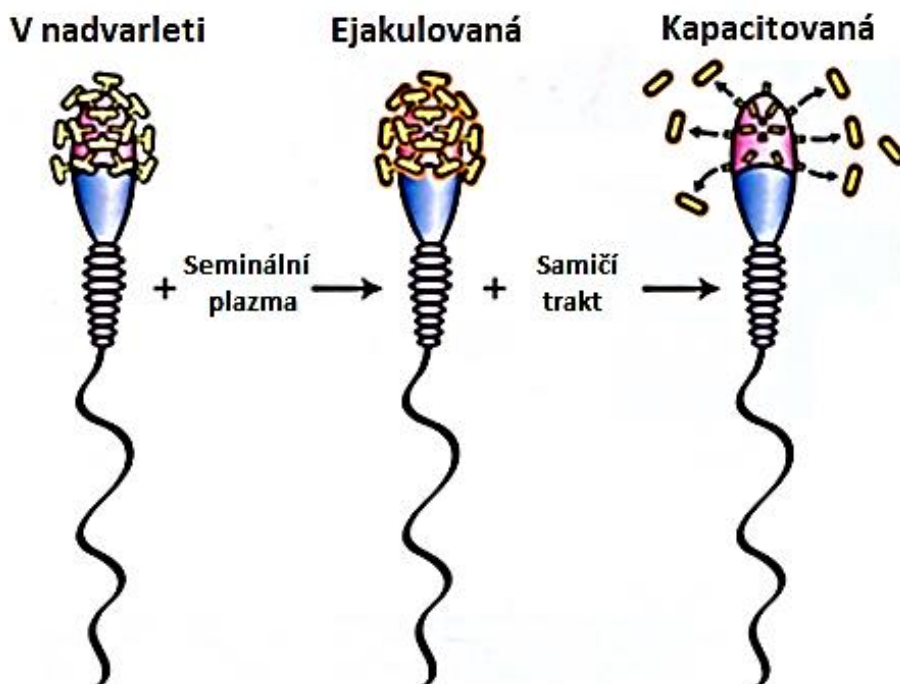
Kapacitace je proces, ve kterém spermie projde řadou fyziologických a biochemických změn, jež vedou k získání oplozovací schopnosti spermie. Tento děj se odehrává v pohlavním ústrojí samice (Austin 1952).

Mezi fyziologické a biochemické změny, jež jsou zahrnuty v procesu, patří aktivace iontových kanálů, změny periferních membránových faktorů, externalizace membránových receptorů, zvýšení intracelulárního cAMP (Fraser 1981), změny v intracelulárním složení iontů spermie a změnu její motility (Yanagimachi 1994), dále změny v lipidovém složení membrány a změnu fluidity membrány (Aitken et al. 1995). Také dochází ke změnám distribuce lipidů vnější a vnitřní vrstvy plazmatické membrány (Yanagimachi 1994). Všechny změny, ke kterým během kapacitace dochází, však nejsou dosud známé.

U kapacitovaných spermií dojde k tzv. hyperpolarizaci membrány, která slouží k regulaci schopnosti spermie vytvářet přechodné zvýšení vápenatých iontů, což umožňuje schopnost spermie spustit akrozomální reakci při kontaktu se zónou pellucidou. U nekapacitovaných spermií proto k akrozomální reakci nedochází (Arnoult et al. 1999).

Mimo intracelulární změny dochází během kapacitace taktéž ke změnám na povrchu spermií. Při tomto procesu dojde k odstranění proteinů seminální plazmy (Jelínek & Koudela 2003), která obsahuje dekapacitační faktory, akrozóm stabilizující faktory, glykoproteiny a inhibitor akrozinu. K tomuto odstranění dojde adsorpcí povrchem spermie. Také se reorganizují a modifikují molekuly na povrchu plazmatické membrány (Jones 1989) (viz Obr. č. 5).

Proces kapacitace se z hlediska trvání druhově velmi liší. Obecně lze říci, že tento děj trvá u různých druhů 2–14 hodin. Jelínek & Koudela (2003) uvádí, že u býčích spermií trvá kapacitace asi 6–7 hodin, u spermií hřebce však 4 hodiny, u spermií kance 4–6 hodin a u spermií králíka dokonce až 14 hodin.



Obrázek č. 5 - Porovnání spermií v různých fázích. Spermie nacházející se v nadvarletí získají oplozovací schopnost a jejich plazmatická membrána je obohacena o cholesterol a další proteiny. Ejakulované spermie jsou poté potaženy proteiny seminální plazmy. V samičím reprodukčním traktu následně dojde ke kapacitaci, při které se odstraní proteiny seminální plazmy spolu s dalšími molekulami. Spermii je pak umožněno podstoupit akrozomální reakci (Ferenc et al. 2011)

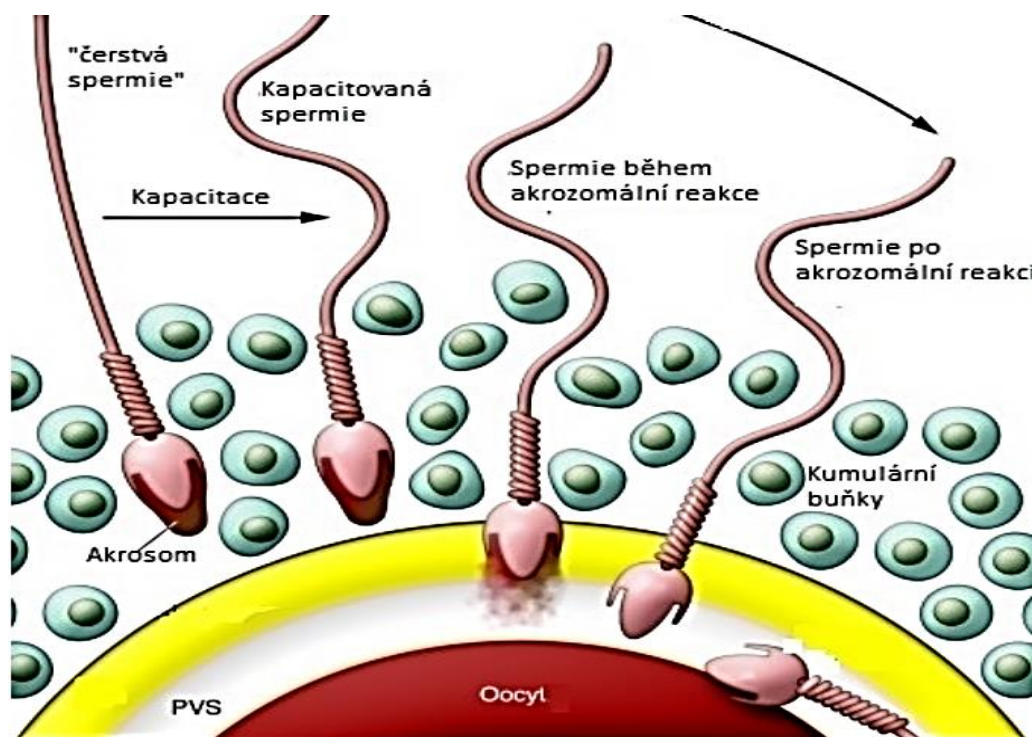
3.1.5 Akrozomální reakce

Akrozom je specifická organela spermií, která se nachází v anteriorní části hlavičky spermie, její hlavní rolí v průběhu oplozování je umožnění průběhu akrozomální reakce. Tato organela se nachází pouze u spermií, a to u těch živočišných druhů, u kterých je potřeba před oplozením proniknout přes extracelulární obaly oocyty (Yanagimachi 1994). Jedná se o dvouvrstevný váček, který obsahuje hydrolytické enzymy a mukopolysacharidy potřebné k rozrušení vrstvy folikulárních buněk (corona radiata) a k překonání glykoproteinového obalu vajíčka, zony pellucidy (Jelínek & Koudela 2003) (viz Obr. č. 6).

Existují dva možné spouštěcí mechanismy pro spuštění akrozomální reakce *in vivo*. Jedním z nich je kontakt s glykoproteinovým obalem zony pellucida a druhým zvýšená hladina progesteronu (Florman et al. 2008). Do nedávna se mělo za to, že kontakt se zónou pellucidou je pro tuto reakci významnější, protože se předpokládalo že akrozomální reakce se spustí ve

chvíli, kdy se spermie naváže na vajíčko v místě nacházejících se glykoproteinů (Buffone et al. 2009). Nicméně nedávné výzkumy na myších naznačují, že akrozomální reakce je často zahájena ještě před dosažením zony pellucidy (Hino et al. 2016; La Spina et al. 2016), což poukazuje na to, že primárním mechanismem akrozomální reakce by nemusel být kontakt spermie se zónou pellucidou. Co se týče progesteronu, je obecně známé, že tento hormon je secernován kumulárními buňkami obklopující oocyt a že je akrozomální reakci schopen iniciovat (Jin et al. 2011).

Po setkání spermie s glykoproteinovým obalem zony pellucidy vznikne pomocí ZP3 proteinu (protein zony pellucidy) vazba mezi spermii s vajíčkem. Následuje sekundární vazba mezi proteinem ZP2 a ZP2 receptorem na hlavičce spermie a poté dojde k fúzi vnitřní a vnější membrány akrozomu. Tato fúze je zapříčiněna právě navázáním ZP3 proteinu na ZP3 receptor. Následkem toho se uvolní obsah akrozomálního váčku, který obsahuje hydrolytické enzymy (hyaluronidázu, akrozin) nutné k překonání zony pellucidy, ale také další látky, které mají nejrůznější role nezbytné k oplození vajíčka (Yanagimachi 1994). Jedná se například o fruktózu, manózu, galaktózu, různé lipidy a kyselou a alkalickou fosfatázu (Gamčík et al. 1976; Hightower et al. 1999).



Obrázek č. 6 - Schéma kapacitace a akrozomální reakce spermie (Ikawa et al. 2010) .

K iniciaci akrozomální reakce dochází přes již zmíněný ZP3 receptor. Tento receptor aktivuje Na^+/H^+ pumpu, což vede k depolarizaci membrány, k otevření Ca^+ kanálů a ke vstupu Ca^{2+} iontů do cytoplazmy, což zapříčiní zahájení akrozomální reakce. Kromě zvýšení hladiny Ca^{2+} iontů dochází i ke změnám pH v hlavičce spermie (Roderick et al. 2003).

3.2 Sulfan

Sulfan (H_2S) byl ještě před několika lety považován za toxický plyn. Bylo však prokázáno, že i sulfan má v organismu savců velmi důležitou funkci, a to jako plynná signální molekula, neboli gasotransmitter (Kimura et al. 2012). Bylo zjištěno, že je produkován v mnoha savčích tkáních a že reguluje celou řadu fyziologických procesů v těle. Hraje důležitou roli v patogenezi různých onemocnění - od neurodegenerativních až po diabetes mellitus nebo onemocnění kardiovaskulárního systému (Wang 2010). Současné výzkumy ukazují, jaké rozmanité biologické role sulfan v organismu zastává.

3.2.1 Vlastnosti sulfanu

Sulfan je nejjednodušší sloučenina síry s vodíkem. V přírodě vzniká rozkladem organického materiálu a síranů za nepřístupu kyslíku. Jde o bezbarvý plyn, jehož pach je obvykle přirovnáván k pachu zkažených vajec. Lidský čich dokáže tento plyn detekovat při koncentraci, která je 400krát nižší, než je pro organismus toxická (Wang 2002).

Sulfan má podobné charakteristické rysy fyziologických přenašečů jako ostatní gasotransmitery, mezi které patří oxid dusnatý (NO) a oxid uhelnatý (CO). Tyto plyny jsou produkovány endogenně a jsou schopny difúze přes buněčnou membránu, proto nemusí spoléhat na buněčné posly, jenž u jiných signálních molekul zprostředkují vyvolání odpovědi na jejich působení. Jsou to jednoduché molekuly, což jim umožňuje rychle cestovat uvnitř a mezi buňkami. H_2S je pro plazmatické membrány propustný také díky jeho velké rozpustnosti v lipofilních rozpouštědlech, která je pětikrát vyšší než rozpustnost ve vodě (Wang 2002).

Toxicita sulfanu je známa už více než 300 let (Wang 2002) a je závislá na množství vdechnutého plynu (viz Tab. č. 1). Při velkých koncentracích inhibuje cytochrom c v mitochondriích, což vede k inhibici buněčného dýchání. Obecně platí, že fyziologická koncentrace v krvi a ve tkáních se pohybuje pod hodnotou 1 mM, nicméně uvádí se, že hodnoty v krvi v rozsahu od 20 do 300 mM jsou stále bezpečné (Kashfi & Olson 2013).

Hlavní letální následek intoxikace sulfanem je ztráta centrálního řízení dýchání v důsledku biochemických poškození dýchacích center v mozgovém kmeni (Guidotti 1996). Hranice mezi toxickým a fyziologickým účinkem sulfanu v organismu je velmi tenká. Toxická koncentrace tohoto plynu je pouze dvakrát větší než hladina endogenního sulfanu v mozku krysy (Warenycia et al. 1989). Intoxikace myši způsobena NaSH zvýší koncentraci sulfanu pouze o 57 % v mozku, o 18 % v játrech a o 64 % v ledvinách (Mitchell et al. 1993). Vztah mezi dávkou a odezvou účinku sulfanu při fyziologických koncentracích je velmi náhlý a náročný na regulaci, aby se tento fyziologický účinek prudce nepřeměnil v toxický (Zhao et al. 2001). Tudíž je pochopitelné, že savčí buňky musí mít velmi jemné a přesné regulační mechanismy, kterými kontrolují hladiny endogenního sulfanu ve fyziologickém rozmezí (Wang 2002).

Tabulka č. 1 - Fyziologické odpovědi lidského organismu na vystavení působení sulfanu

KONCENTRACE H₂S [ppm^a]	FYZIOLOGICKÁ ODPOVĚĎ
0,003–0,002	prahová hodnota zápachu
3	nepříjemný zápach
20–30	charakteristický zápach zkažených vajec
30	velmi nepříjemný nasládlý zápach
50	podráždění očních spojivek
50–100	podráždění dýchacího traktu
100–200	ztráta čichu (vyčerpání čichového ústrojí)
150–200	ochrnutí čichového ústrojí
250–500	plicní edém
500	úzkost, bolest hlavy, ataxie, závratě, poruchy dýchání, bezvědomí
500–1 000	ochrnutí respiračního traktu vedoucí k smrti, okamžitý kolaps, ochrnutí nervů, srdeční arytmie, smrt
5 000	bezprostřední smrt

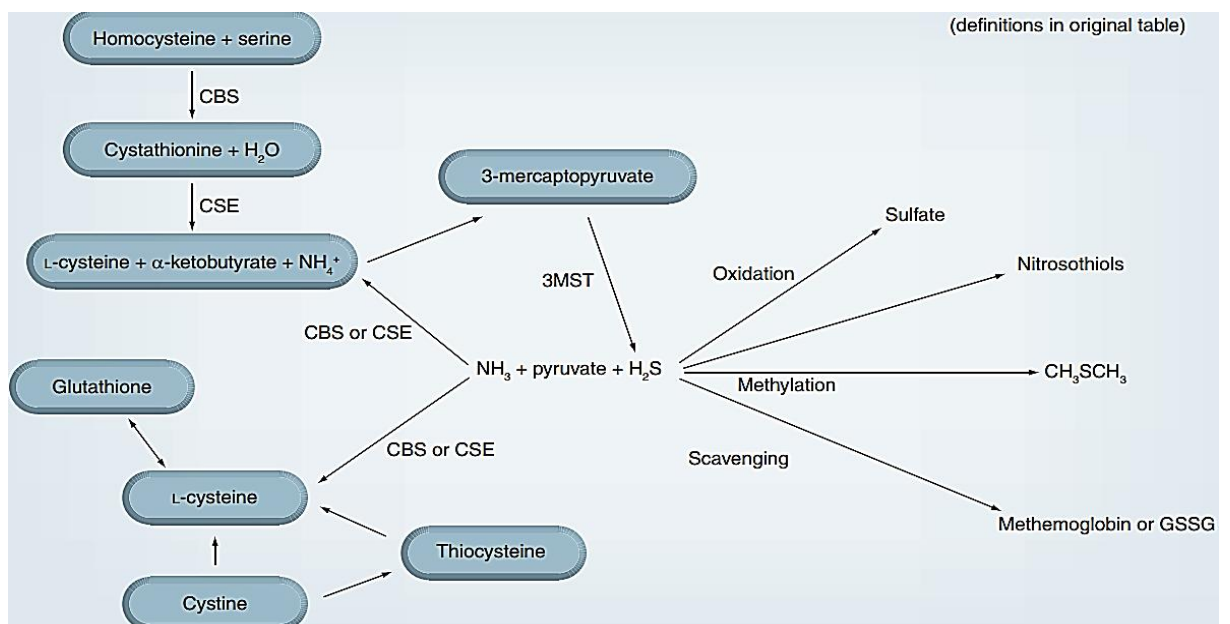
(Beauchamp et al. 1984)

a) ppm = parts per million, počet částic na 1 milion ostatních částic

3.2.2 Produkce a metabolismus sulfanu v organismu

Zhao et al. (2001) publikoval, že koncentrace sulfanu v krysím séru je 46 μM . Kromě cirkulujícího sulfanu je významné množství tohoto gasotransmiteru produkováno v různých tkáních. Některé publikace uvádějí, že fyziologická koncentrace sulfanu ve tkáni mozku se pohybuje mezi 50 až 160 μM (Abe & Kimura 1996; Hasoki et al. 1997). Jiné studie prokázaly, že v cévní soustavě se také produkují měřitelná množství sulfanu (Hasoki et al. 1997; Zhao et al. 2001).

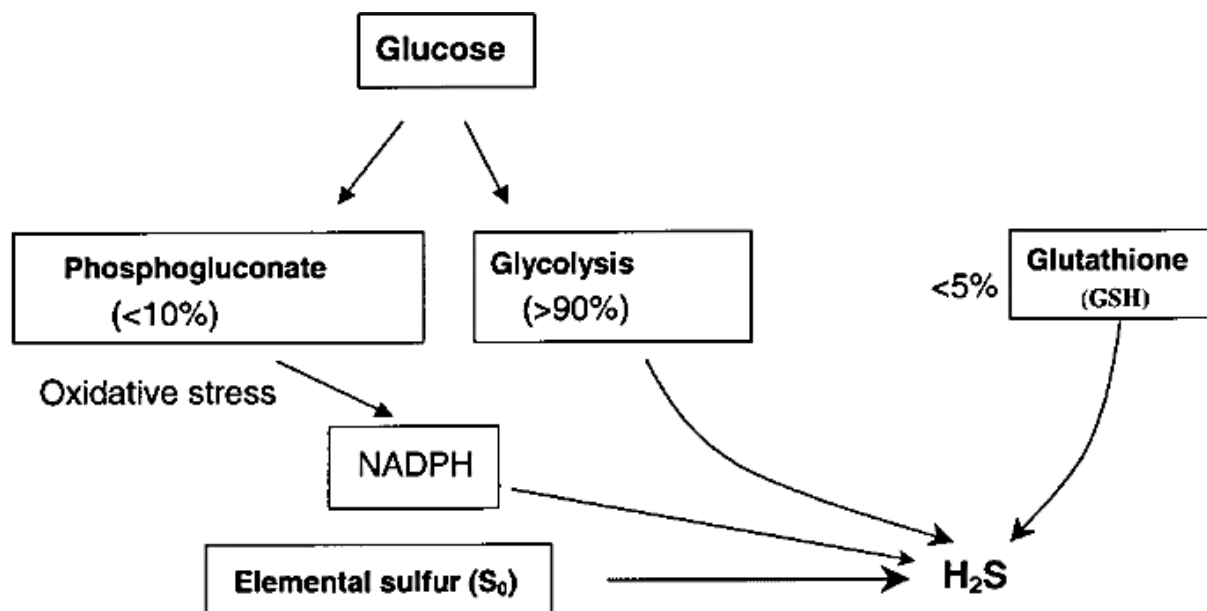
Za většinu tvorby endogenního sulfanu v savčích tkáních jsou zodpovědné dva enzymy - cystathionin- β -syntáza (CBS) a cystathionin- γ -lyáza (neboli cystathionáza, CTH). Tyto enzymy využívají jako hlavní substrát pro tvorbu sulfanu L-cystein (Stipanuk & Beck 1982; Erickson et al. 1990; Bukovska et al. 1994) a homocystein (Wang 2002). Z L-cysteinu se odštěpí thiolová skupina -SH, která je poté využita k tvorbě H_2S . Vedlejšími produkty této reakce jsou pyruvát a amoniak. CBS i CTH jsou závislé na kofaktoru, kterým je pyrodoxal-5-fosfát, což je aktivní forma vitamínu B6. CBS katalyzuje reakci serinu s homocysteinem, čímž dá vzniknout cystathioninu, zatímco CTH rozkládá cystathionin na cystein a α -ketobutyrát (Wang 2002) (viz Obr. č. 7). Nedávné výzkumy dokázaly, že k tvorbě sulfanu může být také využit D-cystein (Shibuya et al. 2013). Dalšími, avšak méně významnými sulfan produkujícími enzymy, jsou cystein aminotransferáza (CAT) a 3-mercaptopyruvát sulfurtransferáza (3-MST)(Kimura 2014).



Obrázek č. 7 - Produkce a metabolismus endogenního sulfanu v organismu. Sulfan je v těle produkován sulfan produkujícími enzymy CBS, CTH, 3-MST a CAT (Wang 2002).

V některých tkáních je potřeba pro tvorbu H₂S jak CBS, tak CTH, zatímco v jiných je jeden enzym dostačující. Výskyt obou enzymů je specifický pro různé tkáně. CBS i CTH byly prokázány například v játrech, ledvinách, mozku, kožních fibroblastech a krevních lymfocytech (Wang 2002). Mezi sulfan produkujícími enzymy a hladinou sulfanu existuje negativní zpětná vazba, proto je aktivita enzymů tlumena, pokud se hladina sulfanu ve tkáních zvýší (Kredich et al. 1973).

Dalším, méně důležitým zdrojem endogenního H₂S, je neenzymatická redukce elementární síry na sulfan za použití redukčních ekvivalentů získaných z oxidace glukózy (Searcy & Lee 1998) (viz Obr. č. 8). Všechny podstatné složky této neenzymatické dráhy jsou přítomny *in vivo*, včetně redukovatelné síry, která byla v milimolárních koncentracích zjištěna v krevním séru člověka (Westley & Westley 1991) a myši (Buzaleh et al. 1990).



Obrázek č. 8 - Neenzymatická produkce sulfanu v savčích tkáních. K tvorbě sulfanu dochází interakcí elementární síry a redukčních ekvivalentů získaných z oxidace glukózy. Platí rovnice $2 \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{S}_0 + 3 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3 + 6 \text{H}_2\text{S} + 3 \text{CO}_2$ (Wang 2002).

Sulfan je dále metabolizován oxidací v mitochondriích nebo metylací v cytosolu a je vylučován převážně ledvinami (Beauchamp et al. 1984). Zvláštní pozornost vyžaduje interakce sulfanu s hemoglobinem. Tak, jako může být hemoglobin za působení CO přeměněn na karboxyhemoglobin, za působení NO na methemoglobin, tak může být hemoglobin za působení sulfanu přetvořen na sulfhemoglobin (Arp et al. 1987), což vede k hypoxii tkání.

3.2.3 Sulfan produkující enzymy, CTH

Jak již bylo zmíněno, dva nejdůležitější enzymy, které produkují endogenní sulfan, jsou cystathionin- β -syntáza (CBS) a cystathionin- γ -lyáza (CTH). Tyto sulfan produkující enzymy využívají k tvorbě sulfanu L-cystein a homocystein (Wang 2002). CBS se nachází převážně v centrálním nervovém systému, zatímco CTH v kardiovaskulárním systému. Jako další se k těmto enzymům řadí 3-mercaptopyruvát sulfurtansferáza (3-MST). 3-MST byl rozpoznán v mozku a endotelu cév. K tvorbě sulfanu využívá společně s dalším sulfan produkujícím enzymem, cystein aminotransferázou (CAT), opět L-cystein a alfa-ketoglutarát (Kimura 2010). 3-MST se nachází hlavně v neuronech, CBS například v astrocytech. Z toho vyplývá, že produkce H_2S v mozku je ovlivňována především těmito dvěma enzymy. 3-MST se dále nachází v hladkosvalových buňkách cév a také v endoteliálních buňkách, zatímco CAT byl lokalizován pouze v cévních endoteliálních buňkách. Dalo by se předpokládat, že endoteliálním buňkám ve stěně cév stačí k produkci sulfanu pouze 3-MST, nicméně enzymatická funkce tohoto enzymu vyžaduje koexistenci CAT (Wang 2010).

Klíčovým enzymem pro kardiovaskulární produkci sulfanu je CTH. Jedná se o enzym, který je převážně exprimován v cytoplazmě srdečních buněk a v buňkách hladkého svalstva cév. Optimální hodnota pH pro CTH je 8,2. V transsulfurační dráze katalyzuje poslední krok pomocí homocysteinu a cysteinu, čímž dá vzniknout sulfanu a lanthioninu. CTH také působí jako cystein-protein sulfhydráza a tím reguluje bílkoviny obsahující síru, jako je například GAPDH a PTPN1 (Huang et al. 2015) .

Do nedávna se předpokládalo, že aktivita CTH je regulována obsahem Ca^{2+} nebo kalmodulinem ve tkáních. Odhadovalo se, že k aktivaci dochází v přítomnosti 1–2 mM vápenatých kationtů, jenže tato koncentrace je příliš vysoká. Ca^{2+} se totiž uvnitř buněk nachází v koncentracích 100 nM až 3 μ M, proto bylo potřebné přehodnotit regulaci aktivity CTH vápenatými kationty. Nedávné studie prokázaly, že CTH produkuje endogenní sulfan při nízké koncentraci Ca^{2+} a jeho produkce je potlačena zvýšením množství vápenatých kationtů. Také bylo prokázáno, že ani kalmodulin není zapojen do řízení aktivity CTH (Mikami et al. 2013).

Zatímco CBS je zodpovědný za tvorbu sulfanu zejména v mozkové tkáni, CTH se podílí na produkci sulfanu převážně v periferních tkáních, jako jsou játra a ledviny, dále je důležitý v kožních fibroblastech a krevních lymfocytech (Wang 2002). Je také považován za největšího producenta endogenního sulfanu v kardiovaskulárním systému. Byl detekován v různých

cévách i hladkosvalových buňkách cév a dalších tkáních kardiovaskulárního systému (Zhao et al. 2001). Ming et al. (2012) potvrdil aktivitu CTH také v srdeční tkáni. V loňském roce Mo & Hua (2018) publikovali, že sulfan je také produkován v osteoklastech. Proto tato studie tvrdí, že CTH hraje důležitou roli i v osteogenezi. Guo et al. (2012) uveřejnil, že CTH se nachází i ve tkáni prostaty u lidí. Pomocí experimentů bylo zjištěno, že existuje vztah mezi hladinami CTH (a CBS) a androgenními receptory v nádorových liniích prostaty.

3.2.4 Funkce sulfanu v organismu

Ke svému účinku využívá sulfan mnoho signálních cest, jako jsou K_{ATP} kanály (Yang et al. 2005; Munaron et al. 2013), vápenaté kanály typu T (Maeda et al. 2009) a typu L (Marquesda-Silva et al. 2010), iontové kanály TRPA 1 (Streng et al. 2008) a mitochondriální cytochrom c oxidáza (Li & Moore 2008). Mimo jiné také stimuluje cyklický adenosin trifosfát (cAMP) a proteinkinázu A, a tím podporuje aktivaci N-metyl-D-asparát receptoru (NMDA) (Kimura 2000). Bylo dokázáno, že sulfan působí na buňky hladké svaloviny, buňky zánětu, endoteliální buňky, dále ovlivňuje faktory buněčné transkripce, endoplazmatické retikulum nebo mitochondrie (Du et al. 2004; Sivarajah et al. 2009; Polhemus & Lefer 2014).

V roce 1989 bylo zjištěno, že endogenní sulfan se vyskytuje jak v mozkové tkáni potkanů (Warenycia et al. 1989), tak i v mozku lidí (Goodwin et al. 1989; Warenycia et al. 1989). V roce 1995 byla zjištěna aktivita CBS a CTH dokonce v šesti částech mozku, aktivita CBS zde byla asi 30krát větší než aktivita CTH (Awata et al. 1995). Činnost těchto sulfan produkujících enzymů v mozku se postupně zvyšuje po porodu. Později byla mozková tkáň potkanů analyzována pomocí metody Northern blot (metoda sloužící k nalezení RNA transkriptů), která potvrdila přítomnost CBS, nicméně žádná mRNA CTH nebyla zjištěna, proto byl jako hlavní enzym pro produkci sulfanu v mozku označen CBS (Abe & Kimura 1996). Funkce sulfanu v mozku byly postupně odkrývány v 90. letech minulého století. Čerstvě narození potkani byli vystaveni působení H_2S , což vedlo ke změně uvolňování neurotransmiterů v mozku společně se zvýšením hladiny serotoninu a noradrenalinu v mozečku a ve frontálním laloku (Skrajny et al. 1992; Roth et al. 1995). Sulfan potlačuje apoptózu a degeneraci neuronů. Také reguluje vnitrobuněčné pH v mikroglíích a tím snižuje poškození aktivních mikroglíí (Lu et al. 2010). Někteří autoři uvádí, že sulfan chrání neurony před oxidativním stresem a že redukuje množství reaktivních kyslíkových radikálů (Kimura 2014). Zajímavostí je, že také

inhibuje aktivitu peroxynitritu, kterážto byla rozpoznána u nemocí jako Alzheimer, Parkinson nebo Huntington (Olas & Wachowicz 2007) (viz Obr. č. 9).

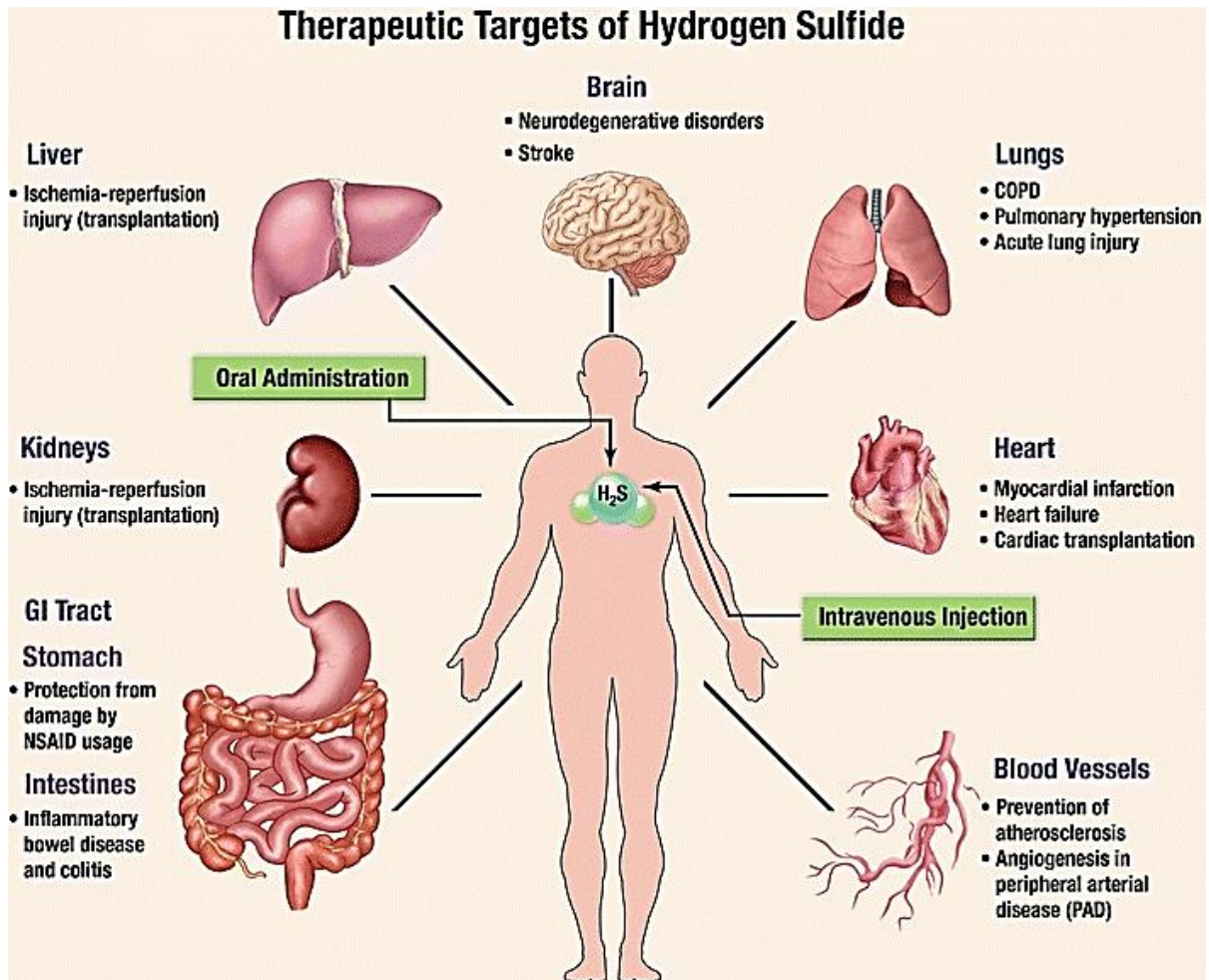
Hladiny sulfanu produkujících enzymů byly taktéž prokázány v kardiovaskulárním systému (viz Obr. č. 9). Hlavní roli producenta sulfanu v kardiovaskulárním systému má CTH, naopak aktivita CBS tu prokázána nebyla (Chen et al. 1999). Fyziologická funkce sulfanu v kardiovaskulárním systému byla pečlivě studována. Bylo zjištěno, že intravenózně podaný H_2S snižuje krevní tlak a má silný vasorelaxační účinek. Také bylo potvrzeno, že v hladkosvalových buňkách cév se vyskytují K_{ATP} , kterých sulfan hojně využívá při regulaci fyziologických procesů (Zhao et al. 2001). Kram et al. (2013) prokázal, že H_2S má také antitrombotické účinky, Wang (2002) navíc publikoval, že sulfan prokazuje známky proangiogenního účinku (tvorba nových cévních cest).

Další zajímavou oblastí je bezpochyby i gastrointestinální trakt (GIT) (viz Obr. č. 9). V této tkáni byly detekovány největší koncentrace sulfanu vůbec. Vysoké koncentrace H_2S jsou způsobeny aktivitou CBS i CTH, ale také metabolickou produkcí síru redukujících bakterií v lumen tlustého střeva. Nyní je velmi dobře známo, že sulfan přispívá k udržování homeostázy na sliznicích GIT a podílí na jejich ochraně a opravách. Tento účinek je připisován protizánětlivým vlastnostem sulfanu. Uvolněný H_2S také snižuje životaschopnost nádorových buněk (Wang 2010).

V dalších studiích se píše o možných účincích sulfanu na napětí endoplazmatického retikula (ER) v kardiomyocytech, ve kterých došlo po podání exogenního sulfanu ke snížení napětí ER (Wei et al. 2010). Jedním z dalších účinků sulfanu je například cytoprotektivita proti hypoxii a zánětlivým poškozením. Calvert et al. (2010) popisuje, jak by sulfan mohl zlepšit situaci při srdečním a jaterním ischemicko-reperfučním poškození. Tohoto protektivního účinku může být dosaženo buď podáním exogenního sulfanu, nebo zvýšením produkce sulfanu endogenního.

Diskutuje se také o tom, zda má či nemá sulfan nějakou roli při zánětlivém procesu. Na základě pozorování zánětlivých procesů u různých druhů zvířat někteří výzkumníci věří, že sulfan hraje jistou podpůrnou roli při léčbě zánětlivých procesů (Bhatia 2009). Na druhou stranu, mnoho jiných výzkumných týmů popsalo přímo protizánětlivé účinky sulfanu. Jedno z možných vysvětlení pro tyto, jak se zdá, opačné role H_2S v zánětlivém ději spočívá v různé koncentraci sulfanu. Nicméně Whiteman et al. (2010) se na tento problém podíval z jiného úhlu pohledu a domnívá se, že rozdíl je dán rychlostí uvolnění sulfanu použitým donorem.

Pokud dojde k pomalému uvolňování sulfanu z GYY4137 (donor H_2S), dojde k utlumení tvorby prozánětlivých mediátorů a zvýšení syntézy chemokinu IL-10, jenž je protizánětlivý. Pokud však dojde k rychlému uvolňování vysokých koncentrací sulfanu z NaHS (taktéž donor H_2S), zvýší se syntéza prozánětlivých faktorů.



Obrázek č. 9 - Terapeutické cíle sulfanu (H_2S). Sulfan je zapojen do patogeneze chronické obstrukční plicní nemoci (COPD), plicní hypertenze a také může snižovat akutní poranění plic. Chrání srdce před infarktem a srdečním selháním a může zabránit vzniku aterosklerózy. Také podporuje angiogenezi a může působit prospěšně při onemocněních periferních cév. Pomáhá léčit zánětlivé onemocnění střev a kolitidu. Může zabránit poškození z nesteroidních protizánětlivých léků v žaludku. Chrání před ischemicko-reperfúzním poškozením ledvin i jater a mimo jiné se zkoumá, jak pomáhá při léčbě neurodegenerativních poruch v mozku a jaké má využití proti vzniku mozkové mrtvice (Predmore & Lefer 2010).

Dále se o účinku sulfanu debatuje v souvislosti s různými onemocněními. Sulfan pravděpodobně hraje roli při onemocněních, jako jsou hyperhomocysteinémie, ateroskleróza, choroby kardiomyocytů, ischemie a v neposlední řadě také diabetes mellitus. Konkrétně tomuto poslednímu onemocnění se již věnovalo mnoho různých prací. V nedávné době mnoho studií prokázalo, že endogenní i exogenní sulfan ovlivňuje sekreci inzulínu, což má za následek změny hladin glukózy na perifériích. Yusuf et al. (2005) potvrdil expresi mRNA CTH a CBS jakožto hlavních sulfan produkujících enzymů ve slinivce. Také zjistil, že výskyt mRNA CBS byl zvýšen u diabetických myší. Výzkum provedený Kaneko et al. (2006) prokázal mRNA a expresi CBS i CTH v Langerhansových ostrůvkách u myší. Yang et al. (2005) potvrdil pomocí genetických metod, že endogenní sulfan snižuje sekreci inzulínu v Langerhansových ostrůvkách pomocí CTH nebo CBS. Hlavním místem působení sulfanu v těchto buňkách jsou opět K_{ATP} kanály, které také stěžejní pro sekreci inzulínu (Ashcroft 2005).

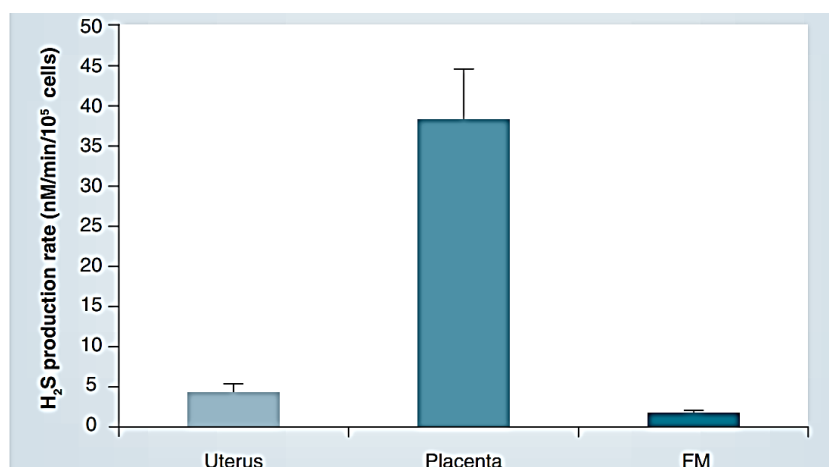
3.2.5 Funkce sulfanu v reprodukci

Dříve se pohlíželo na účinky sulfanu v reprodukčním systému jako na velmi toxické. Avšak před časem se zjistilo, že v savčím samčím i samičím reprodukčním systému dochází v různých tkáních k expresi sulfan produkujících enzymů a tvorbě H_2S (Sugiura et al. 2005; Liang et al. 2006; d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2009; Patel et al. 2009; Srilatha et al. 2009). Existují experimenty, které potvrzují, že CBS i CTH se vyskytuje v reprodukčním systému myší, potkanů a lidí. Avšak aktivita 3-MST zde dokázána nebyla (Patel et al. 2009; Srilatha et al. 2009).

Přítomnost CTH a CBS v savčím samičím reprodukčním systému je velmi rozmanitá. Laboratorní myši se zablokovaným enzymem CBS měly snížený počet rostoucích folikulů a nepravidelný a kratší reprodukční cyklus, zkrácenou dobu samotné říje a diestru (Guzmán et al. 2006). Liang et al. (2006) prokázal přítomnost CBS ve folikulárních a granulóznych buňkách, ne však v samotném oocytu. Nicméně snížená exprese CBS v granulóznych buňkách byla spojena s utlumením meiotického dozrávání myších oocytů (Liang et al. 2007). Potřeba produkce endogenního sulfanu byla rozpoznána také v kumulárních buňkách. Zde je tento gasotransmitter potřebný pro správné dozrávání oocytu (Nevoral et al. 2014). Sulfan tu ovlivňuje iontové kanály a aktivitu kinázy, také se podílí na regulaci apoptózy somatických buněk. Může působit jak pro-apopticky, tak také anti-apopticky. Vždy záleží na dané situaci

a na typu buňky (Yang et al. 2004; Bian et al. 2006; Rinaldi et al. 2006; Yang & Wang 2007). V dalších experimentech bylo prokázáno, že nejvyšší hladina sulfanu v oocytech je pozorována ve zralých oocytech, které zatím nepodstoupily proces stárnutí. Produkce endogenního sulfanu značně klesla (o 29 %) již po 24 hodinách stárnutí oocyty proti zralým oocytům v metafázi II, které nebyly stárnutí vystaveny. Mimo jiné se ukázalo, že exogenní H₂S chrání oocyty před stárnutím, zatímco utlumení produkce endogenního sulfanu vedlo ke zrychlení stárnutí (Krejčová et al. 2015).

CBS i CTH se vyskytují také v děloze, placentě a v plodových obalech (viz Obr. č. 10). Oba enzymy byly prokázány v myometriu, amnionu, chorionu a placentě (Patel et al. 2009) a dokonce v hladkém svalstvu kavernózního tělesa v klitorisu u králíka (Srilatha et al. 2009). Je možné, že H₂S je zapojen do udržení klidového stavu dělohy během těhotenství (Patel et al. 2009). Předpokládá se, že zvýšení hladin CBS a CTH v těhotenství způsobuje lokální produkci sulfanu v myometriu a placentě, což by mohlo tlumit kontrakce dělohy. Bylo prokázáno, že donory sulfanu tlumí u potkanů spontánní stahy dělohy *in vitro* (Sidhu et al. 2001). Jedním z dalších experimentů byl průkaz důležitosti CBS v reprodukci. Myši, u kterých byla aktivita CBS vyřazena, se ukázaly jako neplodné. Tyto myši vykazovaly různé změny v estrálním cyklu, plody se nevyvíjely normálně a narozená mláďata nepřežila (Guzmán et al. 2006). Na druhou stranu, myši, které měly vyřazen enzym CTH, byly plodné a v pořádku rodily živá mláďata. Z toho plyne, že pro samičí reprodukční trakt je stěžejní hlavně CBS (Yang et al. 2008). Další výzkumníci prokázali, že NaHS působí relaxaci v pupečnickové tepně a žíle u lidí *in vitro*. Navíc se zjistilo, že v endotelu a hladké svalovině těchto cév se nachází CBS i CTH (Zhu et al. 2011).



Obrázek č. 10 - Produkce sulfanu v děloze, placentě a plodových obalech (Carson & Konje 2010).

V samčím reprodukčním systému je jedním z nejpozoruhodnějších zjištění fakt, že endogenně produkováný sulfan usnadňuje erekci. V roce 2006 Srilatha et al. (2006) poprvé prokázal, že intravenózně podaný NaHS zvětšuje u primátů délku penisu a tlak v kavernózním tělese. Podání inhibitoru CTH (DL-propargylglycin) potkanům snižuje kavernózní tlak vyvolaný nervovou stimulací. Proerektivní funkce endogenního sulfanu byla později potvrzena stejnou skupinou vědců i u králíků (Shukla et al. 2009). Pomocí experimentů na lidské tkáni bylo zjištěno, že CTH se nachází v trámčité svalové tkáni, hladkosvalových buňkách cév a periferních nervech, zatímco CBS se vyskytuje hlavně v trámčité svalové tkáni (d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2009). Tato zjištění naznačují, že sulfan by mohl mít terapeutické účinky při léčbě erektilní dysfunkce (Zhu et al. 2011).

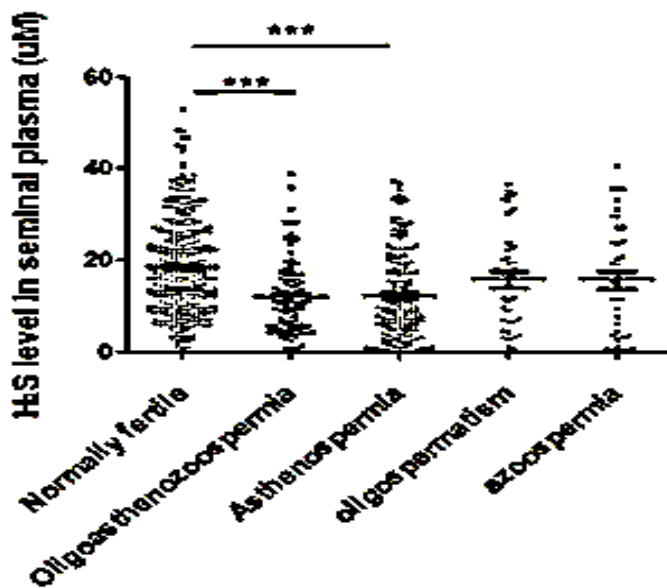
V nedávné době Shukla et al. (2009) studoval počínání sildenafilu (ACS6) v izolované tkáni králičího kavernózního tělíska a porovnával jeho účinky se sildenafil citrát (známým jako Viagra). Bylo zjištěno, že ACS6 a sildenafil citrát rovnocenně uvolnili hladké svaly kavernózního tělíska. Sildenafil se ukázal jako účinnější než sildenafil citrát při snižování oxidativního stresu uvnitř penisu. A navíc, co se týká neodkladných proerektivních účinků, ACS6 může mít i dlouhodobý ochranný účinek proti zvýšenému oxidativnímu stresu v průběhu patologického vývoje erektilní dysfunkce.

Ve varlatech potkanů byla rozpoznána odlišná distribuce CTH a CBS. CTH je podle všeho lokalizován v Sertoliho buňkách a nezralých zárodečných buňkách, mezi které patří i spermatogonie, zatímco aktivita CBS byla zpozorována v Leydigových buňkách, Sertoliho buňkách a zárodečných buňkách (Sugiura et al. 2005). Bylo publikováno, že dostatečný přísun česneku zvyšuje produkci testosteronu v potkaních varlatech, což naznačuje, že sulfan může hrát důležitou roli v regulaci funkce varlat (Oi et al. 2001). Další tkáni, ve které se sulfan nachází, je prostata. Guo et al. (2012) potvrdil, že endogenní sulfan je prostřednictvím CTH i CBS produkován také v této tkáni a je regulován dihydrotestosteronem v LNCaP buňkách (buňky prostaty, které jsou citlivé na androgeny). Předpokládá se, že tento neurotransmitter má mimo jiné vliv na onemocnění prostaty, mezi které se může řadit například rakovina prostaty nebo nezhoubná hyperplazie prostaty.

Aby bylo možné určit, jak sulfan ovlivňuje funkci lidských spermií, Wang et al. (2018) měřil jeho koncentrace v seminální plazmě subfertilních a neplodných pacientů. Zjistilo se, že v porovnání se zdravými muži je u těchto jedinců koncentrace sulfanu v seminální plazmě značně snížena. Tato snížená hladina sulfanu byla převážně nalezena mezi

oligoasthenozoospermickými (mající spermie se sníženou motilitou a koncentrací) a asthenospermickými (mající spermie se sníženou motilitou) pacienty. V experimentu se porovnávaly exprese enzymů CBS i CTH u fertálních mužů a mužů trpícími asthenospermií. Výsledky poukazyvaly na sníženou aktivitu CBS (ne CTH) u asthenospermických jedinců. Mimoto farmakologický inhibitor CBS, kyselina aminooxyoctová (AOAA), značně snížila pohyblivost spermií a hypermotilitu. Tato snížená pohyblivost a hypermotilita spermií způsobena AOAA byla zlepšena podáním GYY4137, ze kterého se sulfan uvolňuje pomalu, avšak k tomuto účinku nedošlo při použití NaHS, díky kterému dojde k rychlému uvolňování vysokých koncentrací H_2S . GYY4137 ale sám o sobě nemá žádný vliv na pohyblivost spermií, pokud se tam nenachází AOAA. Použitím NaHS došlo ke snížení pohyblivosti a hypermotility spermií, která byla dokonce vážnější než při podávání AOAA. Wang et al. (2018) se domnívá, že tento zdánlivě kontrastní dopad NaHS a GYY4137 na pohyblivost spermií je pravděpodobně způsoben tím, že každý z nich využívá jinou cestu k uvolnění H_2S .

Je zajímavé, že snížená pohyblivost spermií byla významně zlepšena podáním exogenního H_2S . K tomu došlo ale pouze u těch asthenospermických vzorků, které měly sníženou koncentraci sulfanu v semenné plazmě. U asthenospermických vzorků s normální hladinou H_2S v semenné plazmě k tomuto účinku vůbec nedošlo (viz Obr. č. 11). Společně tyto výsledky prokazují, že sulfan hraje zásadní roli také ve funkci spermií bez ohledu na jeho přítomnost v semenné plazmě. Ke snížení pohyblivosti spermií došlo i u myší se sníženou koncentrací H_2S z důvodu podání LPS (lipopolysacharid), dále u diabetických myší a u myší s nedostatkem CBS. Pokud se těmto myším podal GYY4137, parametry jejich pohyblivosti byly navráceny do původních hodnot. V tomto případě měl i NaHS stejné protektivní účinky jako GYY4137 (Wang et al. 2018). Mezi další významné počiny těchto výzkumníků patřilo zjištění, že sulfan chrání varlata před oxidativním stresem.



Obrázek č. 11 - Koncentrace sulfanu v semenné plazmě u mužů. Muži s fertilními spermii (n = 334), oligoasthenozoospermii (mající sníženou motilitu a koncentraci, n = 89), asthenospermii (mající sníženou motilitu, n = 153), oligospermii (mající sníženou koncentraci, n = 41) a s azoospermii (nemající spermie v ejakulátu, n = 40) (Wang et al. 2018).

3.3 Imunocytochemie

Imunocytochemie je laboratorní metoda, která využívá protilátku k detekci antigenu ve tkáních. Princip této metody spočívá ve fixaci antigenu ve tkáních, následuje blokáce nescifických vazeb a poté inkubace se specifickými protilátkami. Nakonec dochází k vizualizaci protilátky a zhodnocení reakce na mikroskopu. Primární protilátky se získávají na laboratorních zvířatech (nejčastěji myši a králíci) a to imunizací zvířete na antigen, který je do zvířete vpraven. Opakovanou injekcí dochází ke stimulaci tvorby potřebných protilátek, které se získají odebráním séra z daného laboratorního zvířete. Sekundární protilátky se získávají na jiném živočišném druhu (nejčastěji na koze) proti imunoglobulinu primární protilátky (např. koží protilátka proti myši). Tato sekundární protilátka je značena a váže se na primární protilátku. Jako značení se mohou využívat enzymy, fluorescenční barvivo nebo koloidní zlato. Následně se reakce zhodnotí na optickém, fluorescenčním nebo elektronovém mikroskopu (Alberts 1998). Imunocytochemie může být přímá nebo nepřímá. Přímá využívá pouze reakce antigenu a značené primární protilátky, nepřímá využívá vazby sekundární protilátky na primární, přičemž sekundární protilátka je značena.

4 Materiál a metody

4.1 Použité protilátky

V experimentu byla jako primární protilátka použita polyklonální protilátka proti enzymu cystathionin- γ -lyáze (ThermoFisher Scientific, USA). Parametry primární protilátky jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2 - Detaily a jednotlivé parametry použité primární protilátky.

PRIMÁRNÍ PROTILÁTKA - POLYKLONÁLNÍ anti-CTH	
DETAILY PRODUKTU	
Objem	100 μ l
Hostitelský organismus	králík
Imunogen	rekombinantní fragment odpovídající oblasti uvnitř aminokyselin 222 a 469 v CTH1L
Forma	kapalina
Koncentrace	0,59 mg/mL
Purifikace	antigen afinitní chromatografií
Skladovací pufr	PBS, pH 7, s 20% glycerolem
Obsahuje	0,025 % Proclin 300
Podmínky skladování	- 20 °C, vyhnout se opakovanému zmrazování a rozmrazování
REAKTIVNÍ DRUHY	
Testované reaktivní druhy	člověk, myš, krysa
APLIKACE A ŘEDĚNÍ	
Western Blot (WB)	1 : 500–1 : 3 000
Imunofluorescence (IF)	1 : 100–1 : 1 000
Imunocytochemie (ICC)	1 : 100–1 : 1 000
Imunohistochemie Parrafin (IHC (P))	1 : 100–1 : 1 000
Imunoprecipitace	závislé na typu chemické analýzy

ThermoFisher Scientific, USA.

Jako sekundární protilátka byla v pokusech použita kozí polyklonální sekundární protilátka proti králičímu imunoglobulinu (anti-rabbit) konjugovaná s Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, USA). Parametry sekundární protilátky jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3 - Detaily a jednotlivé parametry použité sekundární protilátky.

SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKA - POLYKLONÁLNÍ KOZÍ anti-RABBIT + ALEXA FLUOR 488	
DETAILY PRODUKTU	
Objem	500 µl
Hostitelský organismus	koza
Imunogen	těžké a lehké řetězce IgG
Konjugace	Alexa Fluor 488
Forma	kapalina
Koncentrace	2 mg/mL
Purifikace	provedena
Skladovací pufr	PBS, pH 7,5
Obsahuje	5 mM azidu sodného
Podmínky skladování	- 4 °C, skladovat ve tmě
REAKTIVNÍ DRUHY	
Reaktivní druhy	králík
APLIKACE A ŘEDĚNÍ	
Průtoková cytometrie (Flow)	1–10 µg/mL
Imunofluorescence (IF)	4 µg/mL
Imunocytochemie (ICC)	4 µg/mL

ThermoFisher Scientific, USA.

4.2 Příprava vzorků

V experimentu byl použit ejakulát odebraný od kanců plemene Landrace, linie 9120 z komerčních inseminačních dávek z chovné stanice PROAGRO Nymburk a. s. Parametry inseminační dávky jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4 - Detaily a jednotlivé parametry použité inseminační dávky.

INSEMINAČNÍ DÁVKA KANCŮ PLEMENE LANDRACE, LINIE 9120	
Ředidlo	komerční ředidlo SUS
Motilita spermií	85 %
Objem	80–100 ml
Koncentrace	5×10^7 spermií/ml
Podmínky skladování	skladovat při teplotě 17 °C

PROAGRO Nymburk a. s., Česká republika

Z dávek byly ihned po dovezení odebrány vzorky, které byly kapacitovány. Byly vytvořeny čtyři skupiny s rozdílnou dobou kapacitace (30 minut, 60 minut, 90 minut, 120 minut). Součástí každé skupiny byly kapacitované spermie, kapacitované spermie s přidavkem donoru sulfanu a kontrolní skupina s dimethylsulfoxidem (150 μ mol DMSO; Sigma-Aldrich, USA). Pro kapacitaci všech preparátů bylo použito kapacitační médium TL-HEPES-PVA. Z každé skupiny byly odebrány vzorky a spolu se vzorky ejakulovaných spermií po dvojím promytí bylo 20 μ l suspenze spermií v PBS (Sigma-Aldrich, USA) nanášeno na podložní sklíčko a fixováno 50 μ l vymraženého roztoku aceton : methanolu (LACH-NER s. r. o., Neratovice) v poměru 1 : 1. Z každé skupiny bylo takto připraveno 5 sklíček.

Pro každý jednotlivý experiment bylo tedy použito celkem třináct vzorků (viz Tab. č. 5). Na každém podložním sklíčku byly dva vzorky - jeden kontrolní a jeden experimentální.

Tabulka č. 5 - Použité vzorky pro imunocytochemii

VZORKY	ČAS PROBĚHLÉ KAPACITACE			
Ejakulované spermie	-			
Kapacitované spermie	30 minut	60 minut	90 minut	120 minut
Kapacitované spermie s donorem H ₂ S	30 minut	60 minut	90 minut	120 minut
Kapacitované spermie s DMSO	30 minut	60 minut	90 minut	120 minut

4.3 Imunocytochemické stanovení CTH

Preparáty se spermii byly omyty PBS Pasteurovou pipetou a poté na 10 minut ponořeny do kyvety s vymraženým acetonem. Následně byly preparáty opět opláchnuty PBS a zablokovány 150 μ l Super Blocku (ThermoFisher Scientific, USA) po dobu 30 minut. Po opláchnutí byly preparáty inkubovány s primární protilátkou anti-CTH (ThermoFisher Scientific, USA) ředěnou 1 : 100 s PBS přes noc při teplotě 4 °C ve vlhké komůrce. Po oplachu v PBS následovala inkubace se 75 μ l sekundární protilátky anti-rabbit konjugované s Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, USA) ředěnou 1 : 300 s PBS. Inkubace probíhala 60 minut při pokojové teplotě. Poté byly preparáty montovány do montovacího média Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, USA). Takto připravené preparáty byly uchovávány při 4 °C a poté snímány konfokálním mikroskopem (Zeiss LSM 800, Německo) při zvětšení 630krát. Intenzita signálu stanovená jako průměrná intenzita signálu v jednotlivých spermích byla hodnocena pomocí počítačové analýzy obrazu NIS-Elements AR 4.30.01 (Nicon, Japonsko).

4.4 Statistická analýza

Experimenty byly třikrát zopakovány a analýzou obrazu byly získány hodnoty průměrné intenzity signálu, jež byly podrobeny statistické analýze. Statistická analýza pomocí dvouvýběrového t-testu byla provedena v programu Microsoft Excel. Stanovená hladina statistické významnosti byla $p < 0,05$.

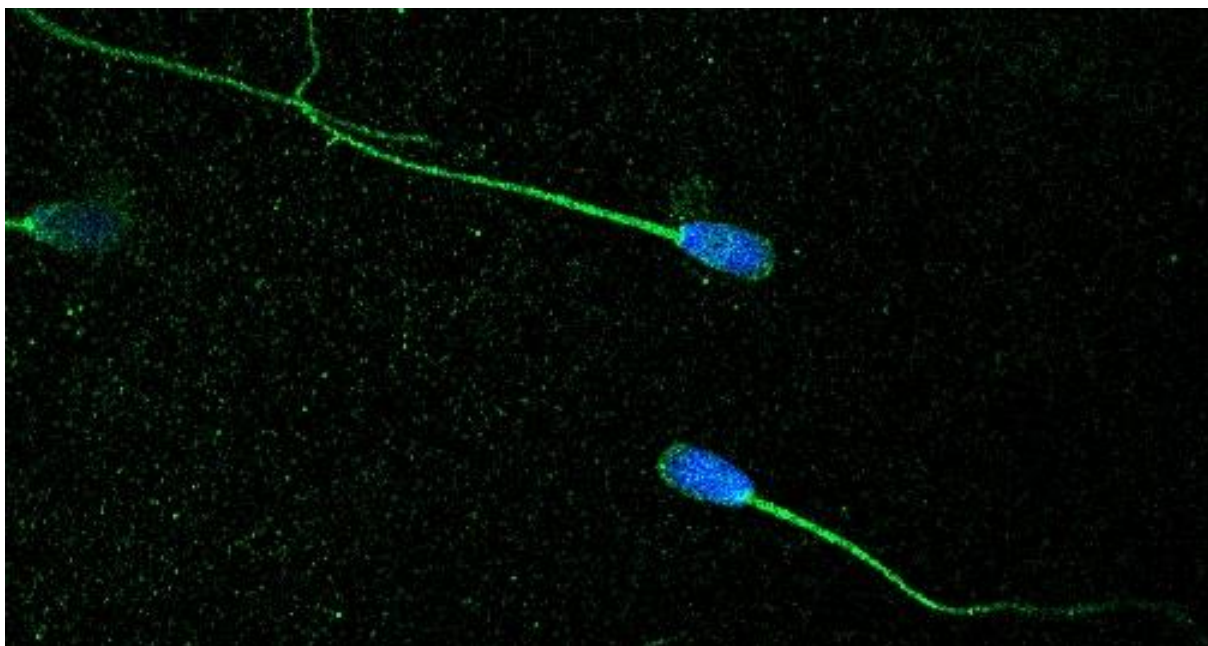
5 Výsledky

Cystathionin- γ -lyáza byla ve spermiích prokázána, a to jak ve vzorcích ejakulovaných tak kapacitovaných spermií. Enzym byl přítomen zejména v bičíku a u ejakulovaných spermií také v akrozomu (Obr. č. 12–20).

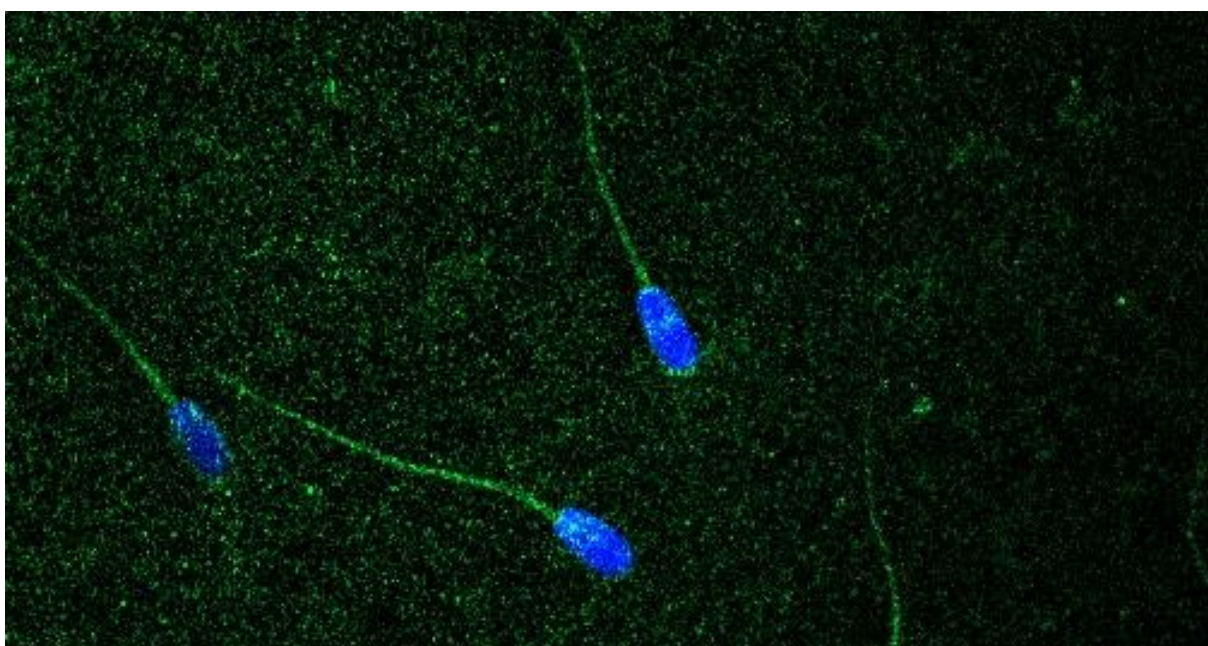
Intenzita signálu byla zhodnocena pomocí analýzy obrazu a vyjádřena jako průměrná intenzita. Nejvyšší průměrná intenzita signálu byla neměřena v ejakulovaných spermiích (29,71). U kapacitovaných spermií intenzita signálu klesala. U spermií, které byly kapacitovány v nemodifikovaném kapacitačním médiu byla zjištěna statisticky významně nižší hodnota průměrné intenzity signálu než u ejakulovaných spermií. Rozdíl v průměrné intenzitě signálu mezi spermiemi kapacitovanými v nemodifikovaném kapacitačním médiu a spermiemi kapacitovanými v kapacitačním médiu s přidavkem donoru sulfanu byl sice statisticky významný, ale s pravděpodobností velmi blízké stanovené hladině významnosti (Obr. č. 21-22).

Na fotografiích je zřetelné, že se s délkou kapacitace zhoršovala kvalita spermií. Jako nejvhodnější se jeví délka kapacitace 30 min.

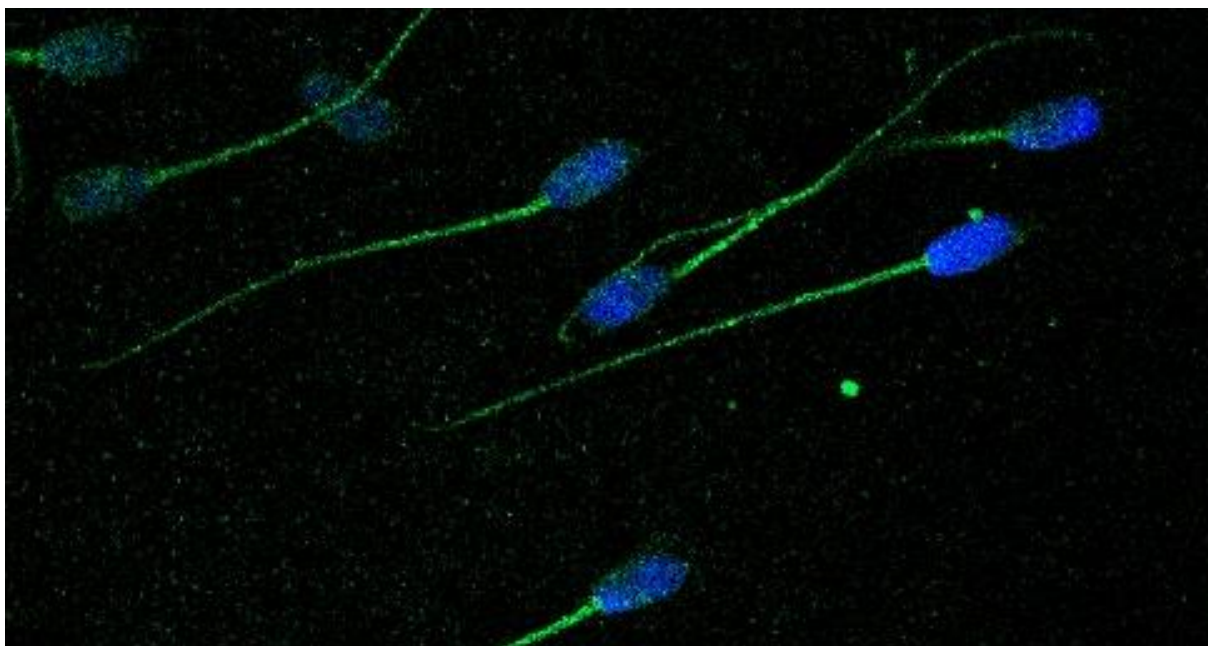
Ve výsledcích nejsou uvedeny skupiny, které byly kapacitovány v médiu s přidavkem DMSO. Tato skupina byla kontrolní pro ověření, že DMSO neovlivnilo expresi enzymu. Rozdíly nebyly zjištěny.



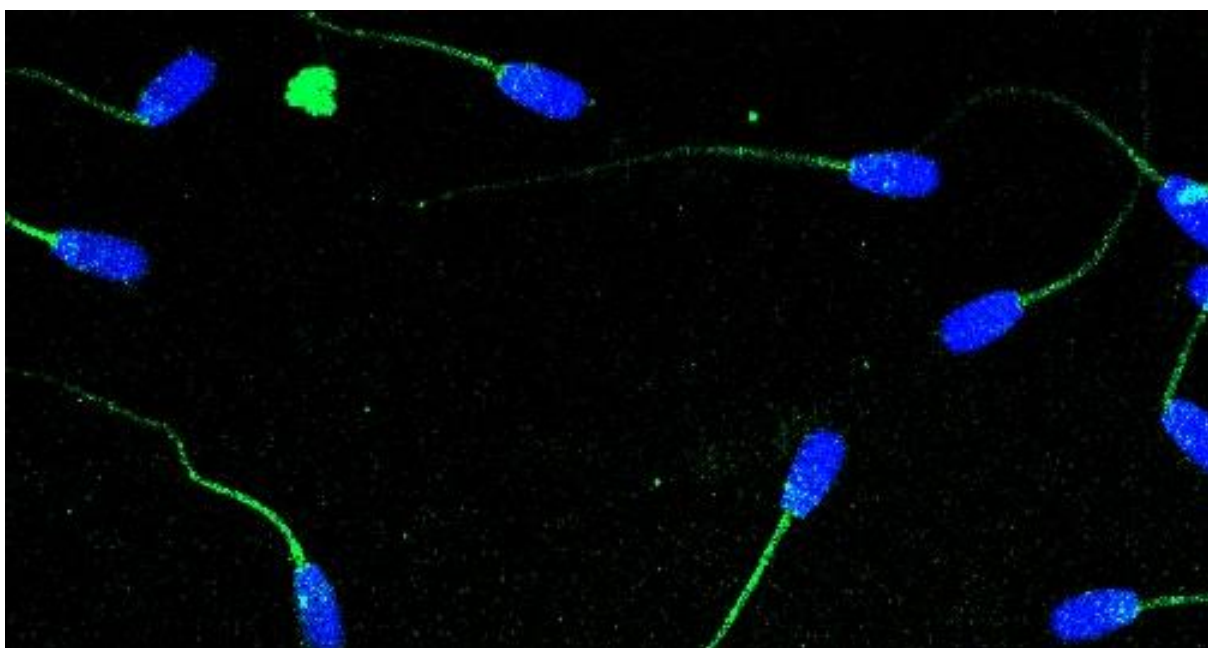
Obrázek č. 12 - Intenzita signálu CTH ejakulovaných spermíí, modře chromatin DAPI, zeleně Alexa Fluor 488, zvětšení 630krát



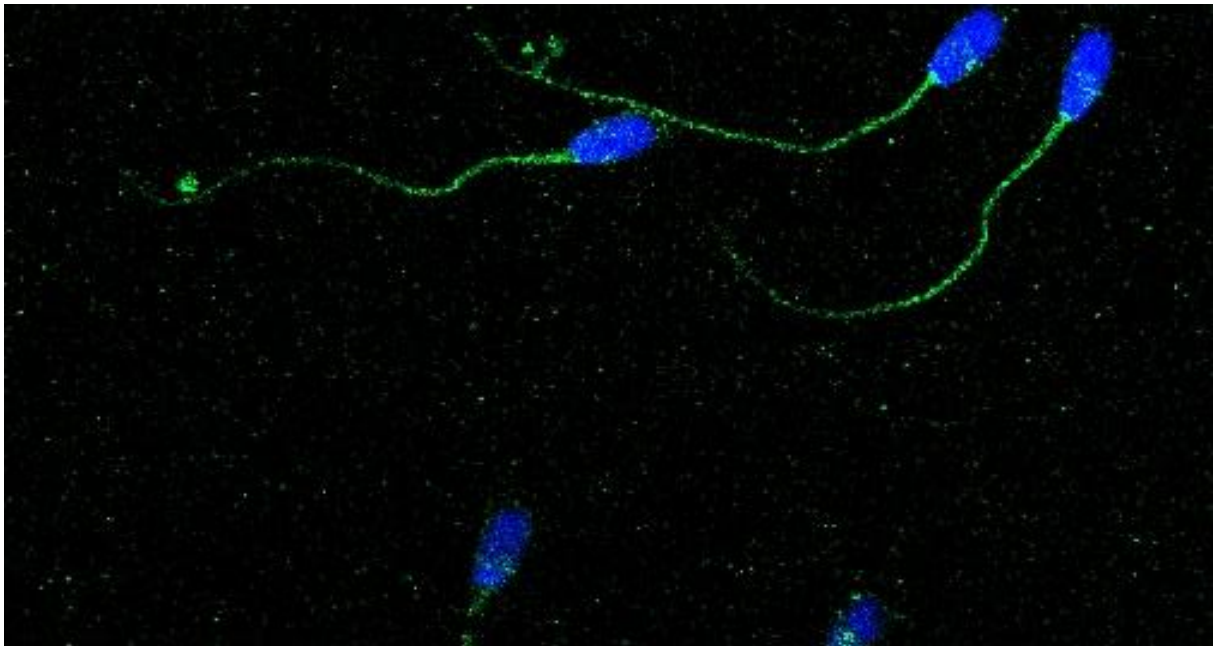
Obrázek č. 13 - Intenzita signálu CTH po 30 minutové kapacitaci spermíí, modře chromatin DAPI, zeleně Alexa Fluor 488, zvětšení 630krát



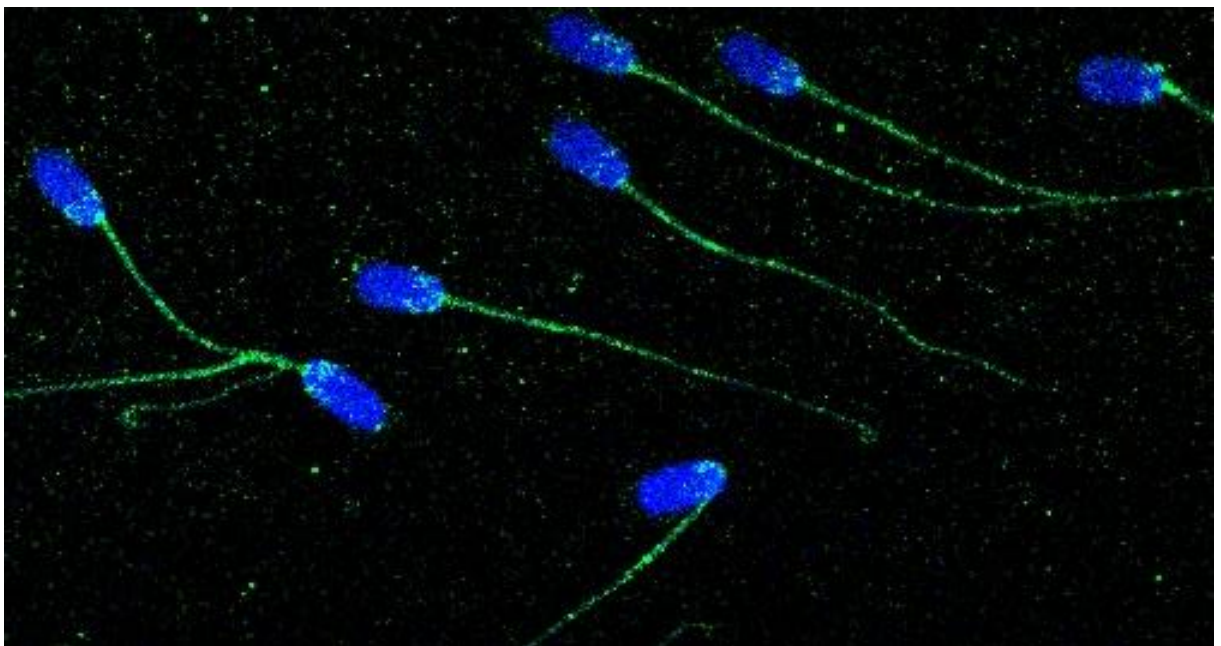
Obrázek č. 14 - Intenzita signálu CTH po 60 minutové kapacitaci spermií, modře chromatin DAPI, zeleně Alexa Fluor 488, zvětšení 630krát



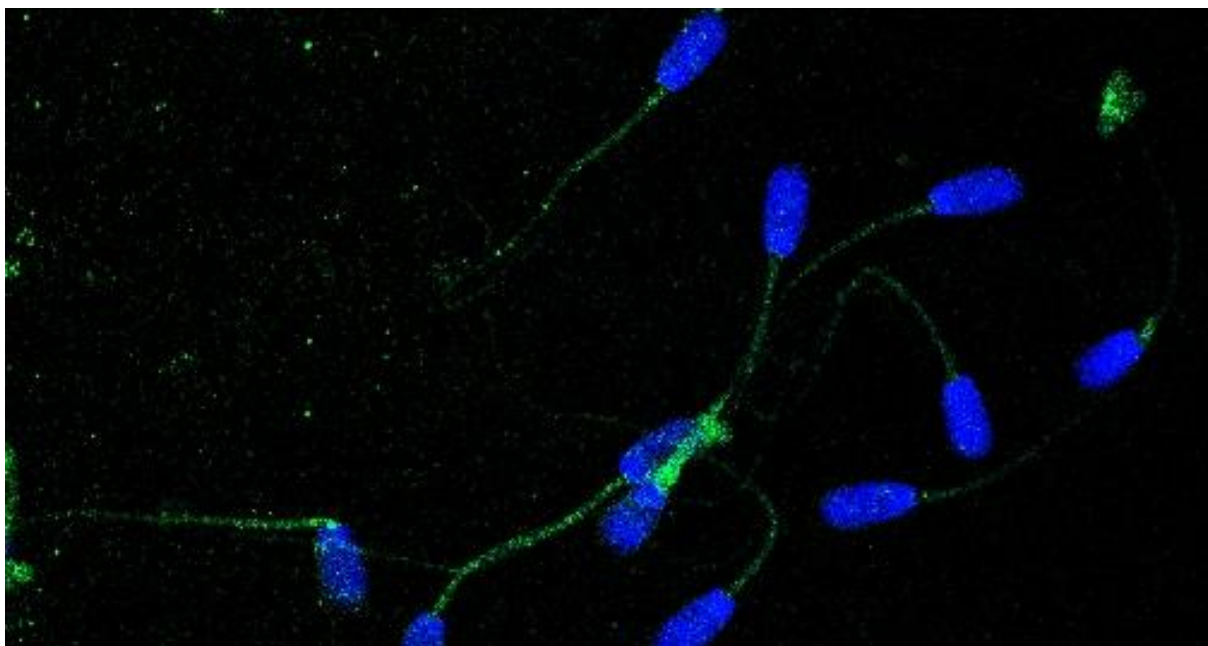
Obrázek č. 15 - Intenzita signálu CTH po 90 minutové kapacitaci spermií, modře chromatin DAPI, zeleně Alexa Fluor 488, zvětšení 630krát



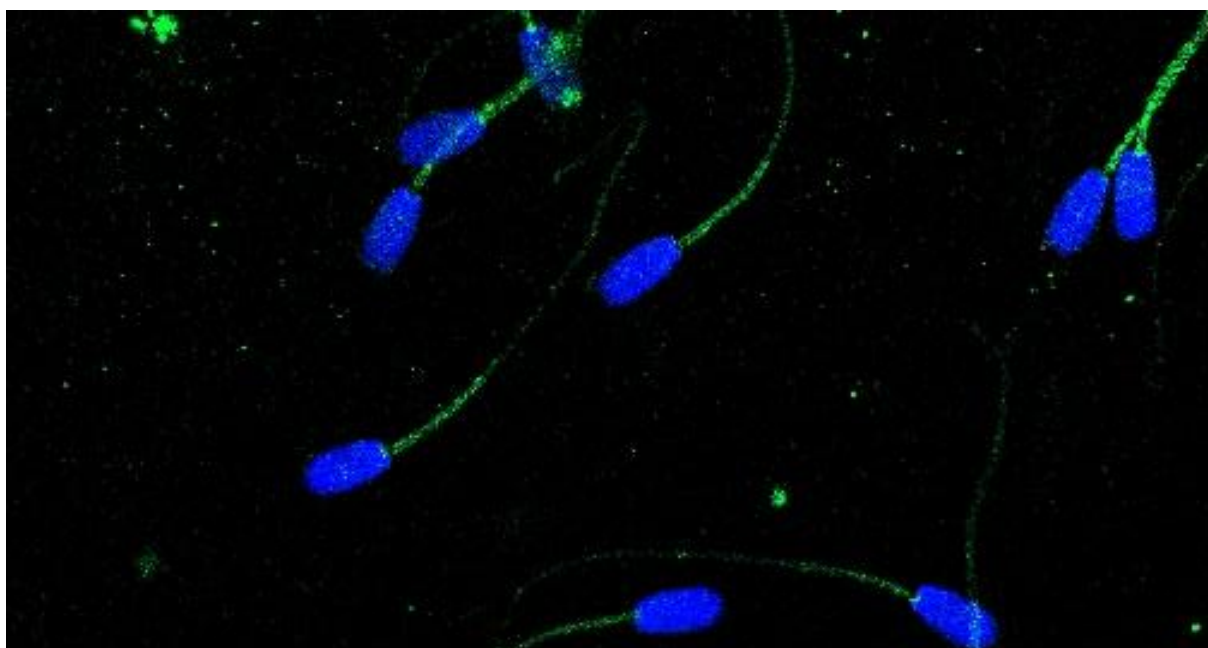
Obrázek č. 16 - Intenzita signálu CTH po 120 minutové kapacitaci spermií, modře chromatin DAPI, zeleně Alexa Fluor 488, zvětšení 630krát



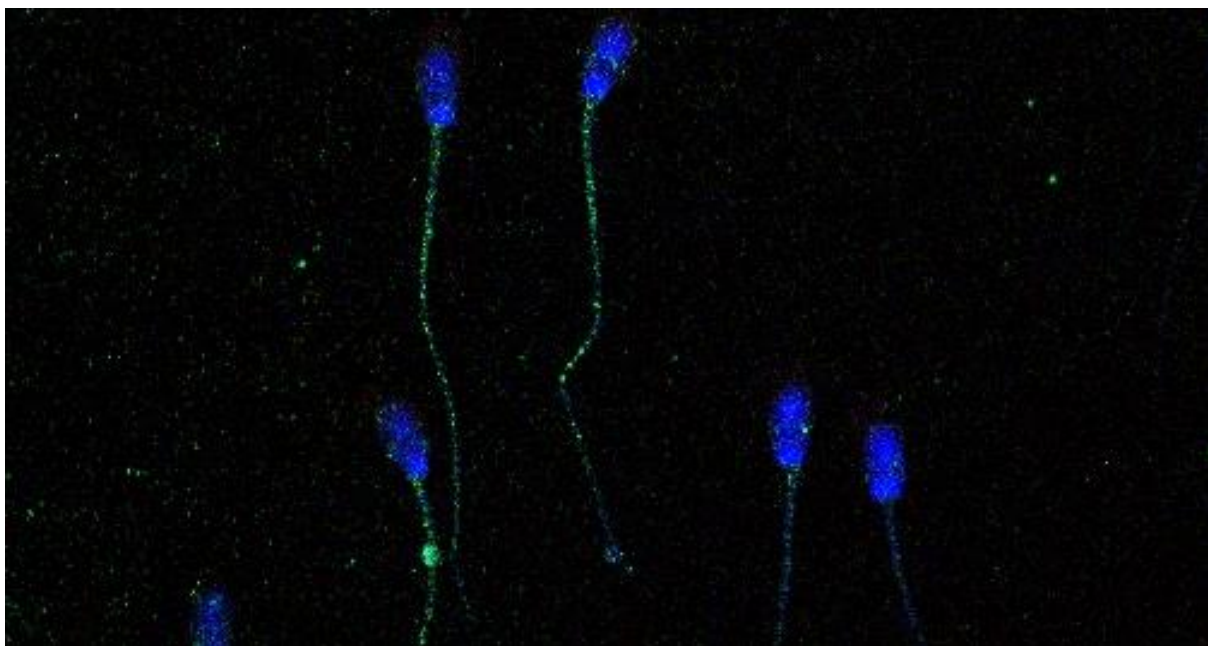
Obrázek č. 17 - Intenzita signálu CTH po 30 minutové kapacitaci spermií, s donorem sulfanu, modře chromatin DAPI, zeleně Alexa Fluor 488, zvětšení 630krát



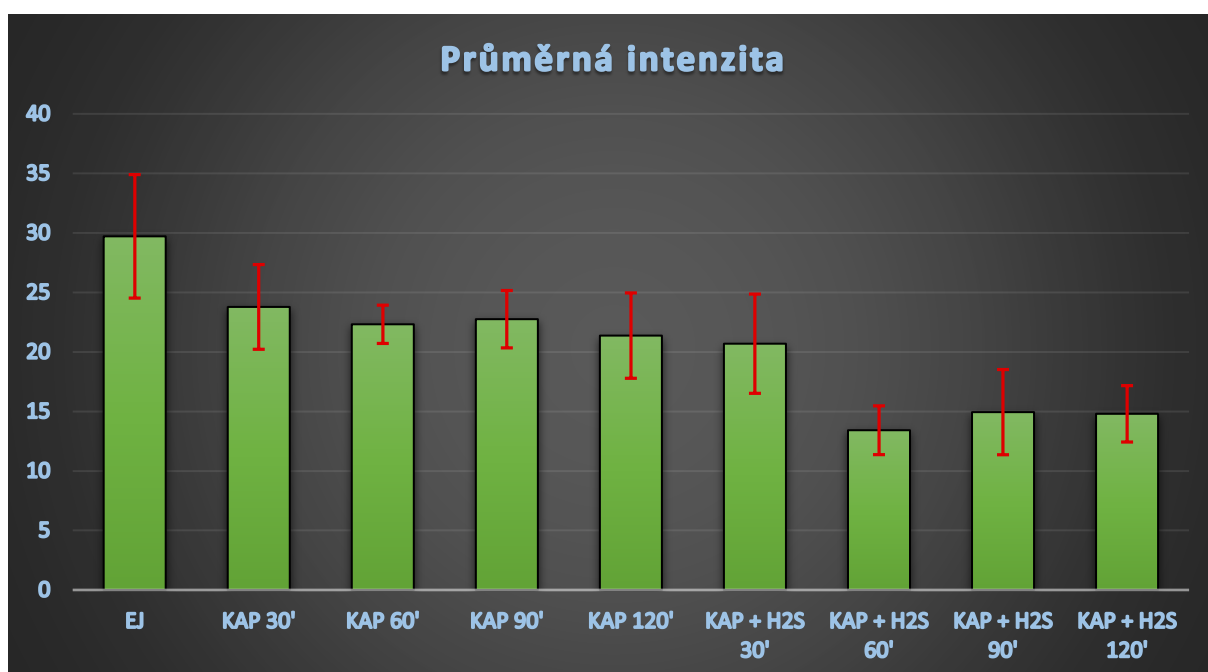
Obrázek č. 18 - Intenzita signálu CTH po 60 minutové kapacitaci spermií, s donorem sulfanu, modře chromatin DAPI, zeleně Alexa Fluor 488, zvětšení 630krát



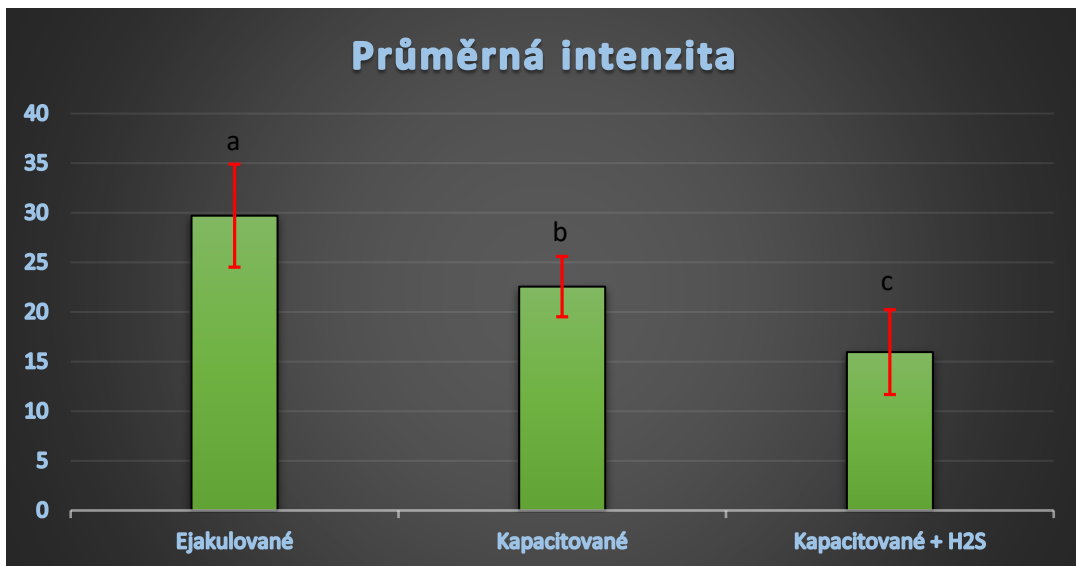
Obrázek č. 19 - Intenzita signálu CTH po 90 minutové kapacitaci spermií, s donorem sulfanu, modře chromatin DAPI, zeleně Alexa Fluor 488, zvětšení 630krát



Obrázek č. 20 - Intenzita signálu CTH po 120 minutové kapacitaci spermií, s donorem sulfanu, modře chromatin DAPI, zeleně Alexa Fluor 488, zvětšení 630krát



Obrázek č. 21 - Průměrná intenzita v jednotlivých preparátech. EJ = ejakulované; KAP 30' = kapacitované 30 minut; KAP 60' = kapacitované 60 minut; KAP 90' = kapacitované 90 minut; KAP 120' = kapacitované 120 minut; KAP + H2S 30' = kapacitované 30 minut, s donorem sulfanu; KAP + H2S 60' = kapacitované 60 minut, s donorem sulfanu; KAP + H2S 90' = kapacitované 90 minut, s donorem sulfanu; KAP + H2S 120' = kapacitované 120 minut, s donorem sulfanu



Obrázek č. 22 - Průměrná intenzita v jednotlivých skupinách preparátů.

a, b, c - Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami.

6 Diskuze

Řada výzkumů prokázala, že sulfan plní v buňkách funkci signální molekuly. Sulfan a sulfan produkující enzymy byly detekovány v nervovém, kardiovaskulárním i reprodukčním systému (Yang et al. 2008; Patel et al. 2009; Srilatha et al. 2009).

Ačkoliv zatím existuje málo prací, které se zabývají funkcí sulfanu při řízení procesů ve spermiích, je známo, že sulfan může zlepšit testikulární dysfunkci u člověka (Wang et al. 2018). U kančích spermiích nebyla produkce sulfanu prokázána, i když funkce signální kaskády sulfanu při apoptóze prasečích oocytů popsána byla (Krejčová et al. 2015).

Cílem této práce bylo prokázat přítomnost enzymu cystathionin- γ -lyázy v kančích spermiích. Tento enzym nebyl zatím v reprodukčním traktu kanců a ve spermiích popsán, i když v samčím reprodukčním traktu byly enzymy produkující sulfan nalezeny již dříve u potkanů v Sertoliho buňkách, v nezralých zárodečných buňkách a také v Leydigových buňkách (Oi et al. 2001). V lidských spermiích byla zatím popsána exprese CTH a CBS (Patel et al. 2009; Srilatha et al. 2009). Výsledky našich experimentů potvrdily, že tento enzym je ve spermiích exprimován. Největší množství cystathionin- γ -lyázy bylo zjištěno u ejakulovaných spermií. Naproti tomu u kapacitovaných spermií se množství proteinu snižovalo. Ve spermiích myší ale naopak Teng et al. (2013), popsal rostoucí množství enzymů při probíhající kapacitaci. Tento fakt může být dán například tím, že u kanců dochází velmi často ke spontánní kapacitaci ejakulovaných spermií. Inseminační dávky, které byly v experimentech využívány, obsahovaly malé procento spontánně kapacitovaných spermií. Jiným možným důvodem může být i fakt, že během kapacitace velmi rychle klesala životaschopnost spermií. To je zřejmé i na snímcích z mikroskopu. Výsledky práce byly zpracovány v rámci komplexního experimentu, jehož součástí bylo i sledování parametrů motility u kapacitovaných spermií po různé době kapacitace. Při kapacitaci trvající 90 a 120 minut byly parametry motility výrazně horší ve srovnání se skupinou kapacitovanou po dobu 30 minut kapacitací (výsledky nejsou součástí této práce).

Bylo zjištěno, že exprese CTH byla signifikantně nižší u spermií, které byly kapacitovány v médiu suplementovaném donorem sulfanu. To by odpovídalo zjištění, jež uvádí Zhao et al. (2016), který popsal negativní vliv donoru sulfanu na motilitu spermií. Zjištěný rozdíl byl však na hranici významnosti, proto by bylo přínosné experimenty s donorem sulfanu zopakovat,

aby se prokázalo, zda donor sulfanu má, či nemá vliv na expresi CTH, a zda je tento rozdíl významný.

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že cystathionin- γ -lyáza je v kančích spermích přítomna, a proto je pravděpodobné, že sulfan se uplatňuje u kančích spermích pravděpodobně při regulaci průběhu kapacitace. Potvrzení této domněnky by mohlo být cílem dalšího výzkumu. Zajímavým zjištěním by také bylo, zda a případně jakou funkci hraje sulfan při akrozomální reakci a při procesu oplození, či jaké biochemické reakce by mohly být ovlivněny v případě, že by ve spermích byl deficit sulfan produkujících enzymů.

7 Závěr

Cílem práce bylo kromě shrnutí současných poznatků o sulfanu jako signální molekuly a sulfan produkujících enzymů také ověření hypotézy, že se sulfan produkující enzym cystathionin- γ -lyáza nachází v kančích spermích. Tato hypotéza byla potvrzena pomocí imunocytochemické metody v experimentální části. Cystathionin- γ -lyáza byla nalezena v ejakulovaných i kapacitovaných spermích. V kapacitovaných spermích byla intenzita signálu nižší. Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že cystathionin- γ -lyáza je v kančích spermích přítomna, a proto je pravděpodobné, že se sulfan pravděpodobně uplatňuje v kančích spermích při regulaci průběhu kapacitace. Potvrzení této domněnky by mohlo být cílem dalšího výzkumu.

8 Seznam použité literatury

- Abe K, Kimura H. 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of Neuroscience* **16**:1066 - 1071.
- Aitken R, Peterson M, Fisher H, Buckingham D, Van Duin M. 1995. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *Journal of Cell Science* **108**:2017 - 2025.
- Alberts B. 1998. *Základy buněčné biologie*. Espero, Ústí nad Labem.
- Arnoult C, Kazam I, Visconti P, Kopf G, Villaz M, Florman H. 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 of the United States of America* **96**:6757 - 6762.
- Arp J, Childress J, Vetter R. 1987. The Sulphide-Binding Protein in the Blood of the Vestimentiferan Tube-Worm, *Riftia Pachyptila*, is the Extracellular Haemoglobin. *Journal of Experimental Biology* **128**:139 - 158.
- Ashcroft F. 2005. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *Journal of Clinical Investigation* **115**:2047 - 2058.
- Austin C. 1952. The 'Capacitation' of the Mammalian Sperm **170**:326.
- Awata S, Nakayama K, Suzuki I, Sugahara K, Kodama H. 1995. Changes in cystathionine gamma-lyase in various regions of rat brain during development. *Biochemistry and Molecular Biology International* **35**:1331 - 1338.
- Beauchamp R, Bus J, Popp J, Boreiko C, Andjelkovich D. 1984. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* **13**:25 - 97.
- Bhatia M. 2009. Hydrogen sulfide and Substance P in inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**:1191 - 1202.

- Bian J, Yong Q, Pan T, Feng Z, Ali M, Zhou S, Moore P. 2006. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **316**:670 - 678.
- Buffone M, Rodriguez-Miranda E, Storey B, Gerton G. 2009. Acrosomal exocytosis of mouse sperm progresses in a consistent direction in response to zona pellucida. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **220**:611 - 620.
- Bukovska G, Kery V, Kraus J. 1994. Expression of human cystathionine beta-synthase in *Escherichia coli*: purification and characterization. *Protein Expression and Purification* **5**:442 - 448.
- Buzaleh A, Vazquez E, del Carmen Batlle A. 1990. Cyanide intoxication--III. On the analogous and different effects provoked by non-lethal and lethal challenged doses. *General Pharmacology* **21**:27 - 32.
- Calvert JW, Coetzee WA, Lefer DJ. 2010. Novel insights into hydrogen sulfide-mediated cytoprotection. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**:1203 - 1217.
- Carson R, Konje J. 2010. Role of hydrogen sulfide in the female reproductive tract. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology* **5**:203 - 213.
- De Kretser D, Loveland K, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. 1998. Spermatogenesis. *Human Reproduction* **13**:1 - 8.
- d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Maffia P, Mirone V, Imbimbo C, Fusco F, De Palma R, Ignarro L. 2009. Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:4513 - 4518.
- Du J, Hui Y, Cheung Y, Bin G, Jiang H, Chen X, Tang C. 2004. The possible role of hydrogen sulfide as a smooth muscle cell proliferation inhibitor in rat cultured cells. *Heart Vessels*. **19**:75 - 80.
- Eddy E, O'Brien D. 1994. The Spermatozoon. Pages Pages 29 - 77 in Neill JD, Knobil E, editors. *Physiology of Reproduction*. Academic Press, Cambridge.

- Erickson P, Maxwell I, Su L, Baumann M, Glode L. 1990. Sequence of cDNA for rat cystathionine gamma-lyase and comparison of deduced amino acid sequence with related Escherichia coli enzymes. *The Biochemical Journal* **269**:335 - 340.
- Ferenc F, Egyetem D, Egyetem N, Egyetem P. 2011. Physiological and reproductional aspects of animal production. Digital Textbook Library, Budapešť. Available from https://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0010_1A_Book_angol_05_termel_eselettan/ch12s07.html (accessed March 2019).
- Florman H, Jungnickel M, Sutton K. 2008. Regulating the acrosome reaction. *The International Journal of Developmental Biology* **52**:503 - 510.
- Fraser L. 1981. Dibutyryl cyclic AMP decreases capacitation time in vitro in mouse spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* **62**:63 - 72.
- Gamčík P, Kozumplík J, a kol. . 1976. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. Príroda, Bratislava.*
- Goodwin L, Francom D, Dieken F, Taylor J, Warenycia M, Reiffenstein R, Dowling G. 1989. Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *Journal of Analytical Toxicology* **13**:105 - 109.
- Guidotti T. 1996. Hydrogen sulphide. *Occupational Medicine* **46**:367 - 371.
- Guo H, Gai JW, Wang Y, Jin HF, Du JB, Jin J. 2012. Characterization of hydrogen sulfide and its synthases, cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase, in human prostatic tissue and cells. *Urology* **79**:483.
- Guzmán M et al. 2006. Cystathionine beta-synthase is essential for female reproductive function. *Human Molecular Genetics* **15**:3168 - 3176.
- Hasoki R, Matsiki N, Kimura H. 1997. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **237**:527 - 531.

- Heckert L, Griswold M. 2002. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Progress in Hormone Research* **57**:129 - 148.
- Hightower J, Boockfor F, et al. . 1999. The standard medical microscopic anatomy course: histology circa 1998. *The Anatomical Record* **257**:96 - 101.
- Hino T, Muro Y, Tamura-Nakano M, Okabe M, Tateno H, Yanagimachi R. 2016. The Behavior and Acrosomal Status of Mouse Spermatozoa In Vitro, and Within the Oviduct During Fertilization after Natural Mating. *Biology of Reproduction* **95**:50 - 51.
- Huang S, Li H, Ge J. 2015. A cardioprotective insight of the cystathionine γ -lyase/hydrogen sulfide pathway. *International Journal of Cardiology. Heart & Vasculature* **7**:51 - 57.
- Chen P, Poddar R, Tipa E, Dibello P, Moravec C, Robinson K, Green R, Kruger W, Garrow T, Jacobsen D. 1999. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Advances in Enzyme Regulation* **39**:93 - 109.
- Ikawa M, Inoue N, Benham A, Okabe M. 2010. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *The Journal of Clinical Investigation* **120**:984 - 994.
- Jelínek P, Koudela K. 2003. *Fyziologie hospodářských zvířat*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno.
- Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba S, Chiba K, Hirohashi N. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:4892 - 4896.
- Jones R. 1989. Membrane remodelling during sperm maturation in the epididymis. *Oxford Reviews of Reproductive Biology* **11**:285 - 337.
- Kaneko Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I. 2006. L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes*. **55**:1391 - 1397.

- Kashfi K, Olson K. 2013. Biology and therapeutic potential of hydrogen sulfide and hydrogen sulfide-releasing chimeras. *Biochemical Pharmacology* **85**:689 - 703.
- Kimura H. 2010. Hydrogen sulfide: from brain to gut. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**:1111 - 1123.
- Kimura H. 2000. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **267**:129 - 133.
- Kimura H. 2014. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric Oxide* **41**:4 - 10.
- Kimura H, Shibuya N, Kimura Y. 2012. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant. *Antioxidants and Redox Signaling* **17**:45 - 57.
- Kittnar O. 2011. *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing, Praha.
- Kredich N, Foote L, Keenan B. 1973. The stoichiometry and kinetics of the inducible cysteine desulfhydrase from *Salmonella typhimurium*. *Journal of Biological Chemistry* **248**:6187 - 6196.
- Krejčová T et al. 2015. Hydrogen sulfide donor protects porcine oocytes against aging and improves the developmental potential of aged porcine oocytes. *Public Library of Science* **10**.
- La Spina F, Puga Molina L, Romarowski A, Vitale A, Falzone T, Krapf D, Hirohashi N, Buffone M. 2016. Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Developmental Biology* **411**:172 - 182.
- Liang R, Yu W, Du J, Yang L, Shang M, Guo J. 2006. Localization of cystathionine beta synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. *Chinese Medical Journal* **119**:1877 - 1883.
- Liang R, Yu W, Du J, Yang L, Yang J, Xu J, Shang M, Guo J. 2007. Cystathionine beta synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reproductive Toxicology* **24**:89 - 96.

- Li L, Moore P. 2008. Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air?. *Trends in Pharmacological Sciences* **29**:84 - 90.
- Lu M, Choo C, Hu L, Tan B, Hu G, Bian J. 2010. Hydrogen sulfide regulates intracellular pH in rat primary cultured glia cells. *Neuroscience Research* **66**:92 - 98.
- Maeda Y, Aoki Y, Sekiguchi F, Matsunami M, Takahashi T, Nishikawa H, Kawabata A. 2009. Hyperalgesia induced by spinal and peripheral hydrogen sulfide: Evidence for involvement of Cav3.2 T-type calcium channels. *Pain* **142**:127 - 132.
- Marques-da-Silva D, Samgan-Arias A, Tiago T, Gutierrez-Merino C. 2010. L-type calcium channels and cytochrome b5 reductase are components of protein complexes tightly associated with lipid rafts microdomains of the neuronal plasma membrane. *Journal of Proteomics* **73**:1502 - 1510.
- McLachlan R, O'Donnell L, Meachem S, Stanton P, de Kretser D, Pratis K, Robertson D. 2002. Identification of Specific Sites of Hormonal Regulation in Spermatogenesis in Rats, Monkeys, and Man. *Recent Progress in Hormone Research* **57**:149 - 179.
- Mendis-Handagama S. 1997. Luteinizing hormone on Leydig cell structure and function. *Histology and Histopathology* **12**:869 - 882.
- Mikami Y, Shibuya N, Ogasawara Y, Kimura H. 2013. Hydrogen sulfide is produced by cystathionine c-lyase at the steady-state low intracellular Ca²⁺ concentrations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **431**:131 - 135.
- Ming F, Zhang W, Yang G, Wang R. 2012. Is cystathionine gamma-lyase protein expressed in the heart?. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **428**:469 - 474.
- Mitchell T, Savage J, Gould D. 1993. High-performance liquid chromatography detection of sulfide in tissues from sulfide-treated mice. *Journal of Applied Toxicology* **13**:389 - 394.
- Mo S, Hua Y. 2018. Cystathionine gamma lyase-H₂S contributes to osteoclastogenesis during bone remodeling induced by mechanical loading. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **501**:471 - 477.

- Munaron L, Avanzato D, Moccia F, Mancardi D. 2013. Hydrogen sulfide as a regulator of calcium channels. *Cell Calcium* **53**:77 - 84.
- Nevoral J et al. 2014. Dual effects of hydrogen sulfide donor on meiosis and cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. *PLOS One* **9**.
- Oi Y, Imafuku M, Shishido C, Kominato Y, Nishimura S, Iwai K. 2001. Garlic supplementation increases testicular testosterone and decreases plasma corticosterone in rats fed a high protein diet. *Journal of Nutrition* **131**:2150 - 2156.
- Olas B, Wachowicz B. 2007. Role of reactive nitrogen species in blood platelet functions. *Plateles* **18**:555 - 565.
- Patel P, Vatish M, Heptinstall J, Wang R, Carson R. 2009. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reproductive Biology and Endocrinology* **7**:10.
- Polhemus D, Lefer D. 2014. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. *Circulation Research* **114**:730 - 737.
- Porter M, Sale W. 2000. The 9 + 2 axoneme anchors multiple inner arm dyneins and a network of kinases and phosphatases that control motility. *Journal of Cell Biology* **151**:37 - 42.
- Predmore B, Lefer D. 2010. Development of hydrogen sulfide-based therapeutics for cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular Translational Research* **3**:487 - 498.
- Reece W. 1998. *Fyziologie domácích zvířat*. Grada, Praha.
- Rinaldi L, Gobbi G, Pambianco M, Micheloni C, Mirandola P, Vitale M. 2006. Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase 3. *Laboratory Investigation* **86**:391 - 397.
- Roderick H, Berridge M, Bootman M. 2003. Calcium-induced calcium release. *Current Biology* **13**:425.

- Roth S, Skrajny B, Reiffenstein R. 1995. Alteration of the morphology and neurochemistry of the developing mammalian nervous system by hydrogen sulfide. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **22**:379 - 380.
- Searcy D, Lee S. 1998. Sulfur reduction by human erythrocytes. *Journal of Experimental Zoology* **282**:310 - 322.
- Seyffarth G, Nelson P, Dunmore S, Rodrigo N, Murphy D, Carson R. 2004. Lipopolysaccharide induces nitric oxide synthase expression and platelet-activating factor increases nitric oxide production in human fetal membranes in culture. *Reproductive Biology and Endocrinology* **2**:29.
- Sharpe R. 1994. Regulation of Spermatogenesis. *The Physiology of Reproduction* **1**:1363-1434.
- Shibuya N, Koike S, Tanaka M, Ishigami-Yuasa M, Ogasawara Y, Fukui K, Nagahara N, Kimura H. 2013. A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nature Communications* **4**.
- Shukla N, Rossoni G, Hotston M, Sparatore A, Del Soldato P, Tazzari V, Persad R, Agelini G, Jeremy J. 2009. Effect of hydrogen sulphide-donating sildenafil (ACS6) on erectile function and oxidative stress in rabbit isolated corpus cavernosum and in hypertensive rats. *BJU International* **103**:1522 - 1529.
- Schöni-Affolter F, Dubuis-Grieder C, Strauch E. 2005. Spermiogenesis (spermatohistogenesis) and structure of the sperm cell. Swiss Confederation. Available from <http://www.embryology.ch/anglais/cgametogen/spermato05.html#spermiohistogenese> (accessed April 2019).
- Sidhu R, Singh M, Samir G, Carson R. 2001. L-cysteine and sodium hydrosulphide inhibit spontaneous contractility in isolated pregnant rat uterine strips in vitro. *Pharmacology & Toxicology* **88**:198 - 203.

- Sivarajah A, Collino M, Yasin M, Benetti E, Gallicchio M, Mazzon E, Cuzzocrea S, Fantozzi R, Thiemermann C. 2009. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. *Shock* **31**:267 - 274.
- Skrajny B, Hannah R, Roth S. 1992. Low concentrations of hydrogen sulphide alter monoamine levels in the developing rat central nervous system. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **70**:1515 - 1528.
- Srilatha B, Hu L, Moore P. 2009. Initial characterization of hydrogen sulfide effects in female sexual function. *The Journal of Sexual Medicine* **6**:1875 - 1884.
- Stenesh J. 1989. *Dictionary of biochemistry and molecular biology*. Wiley, New York.
- Stipanuk M, Beck P. 1982. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochemical Journal* **206**:267 - 277.
- Streng T, Axelsson H, Hedlund P, Andersson D, Jordt S, Bevan S, Andersson K, Högestätt E, Zygmunt P. 2008. Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. *European Urology Supplements* **53**:391 - 399.
- Sugiura Y, Kashiba M, Maruyama K, Hoshikawa K, Sasaki R, Saito K, Kimura H, Goda N, Suematsu M. 2005. Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. *Antioxidants & Redox Signaling* **7**:781 - 787.
- Teng H, Wu B, Zhao K, Yang G, Wu L, Wang R. 2013. Oxygen-sensitive mitochondrial accumulation of cystathionine β -synthase mediated by Lon protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**:12679 - 12684.
- Wang J et al. 2018. Hydrogen Sulfide As a Potential Target in Preventing Spermatogenic Failure and Testicular Dysfunction. *Antioxidants & Redox Signaling* **28**:1447 - 1462.
- Wang R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter?. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **16**:1792 - 1798.

- Wang R. 2010. Hydrogen Sulfide: The Third Gasotransmitter in Biology and Medicine. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**:1061 - 1064.
- Warencya M, Goodwin L, Benishin C, Reiffenstein R, Francom D, Taylor J, Dieken F. 1989. Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochemical Pharmacology* **38**:973 - 981.
- Wei H, Zhang R, Jin H, Liu D, Tang X, Tang C, Du J. 2010. Hydrogen sulfide attenuates hyperhomocysteinemia-induced cardiomyocytic endoplasmic reticulum stress in rats. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**:1079 - 1091.
- Westley A, Westley J. 1991. Biological sulfane sulfur. *Analytical Biochemistry* **195**:63 - 67.
- Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson DB, Moore PK. 2010. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**:1147 - 1154.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian Fertilization. Pages Pages 189 - 317 in Neill JD, Knobil E, editors. *Physiology of Reproduction*. Academic Press, Cambridge.
- Yang G et al. 2008. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*. **322**:587 - 590.
- Yang G, Wang R. 2007. H₂S and cellular proliferation and apoptosis. *Acta physiologica Sinica* **59**:133 - 140.
- Yang G, Sun X, Wang R. 2004. Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *Federation of American Societies for Experimental Biology journal* **18**:1782 - 1784.
- Yang W, Yang G, Jia Y, Wu L, Wang R. 2005. Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *The Journal of Physiology* **569**:519 - 531.

- Yusuf M, Kwong Huat BT, Hsu A, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK. 2005. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **333**:1146 - 1152.
- Zhao Y et al. 2016. Hydrogen Sulfide and/or Ammonia Reduces Spermatozoa Motility through AMPK/AKT Related Pathways. *Scientific Reports* **6**:37884.
- Zhao W, Zhang J, Wang R. 2001. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *The EMBO Journal* **20**:6008 - 6016.
- Zhu X, Gu H, Ni X. 2011. Hydrogen sulfide in the endocrine and reproductive systems. *Expert Reviews* **4**:75 - 82.