



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**Vývoj gonád v průběhu životního cyklu nejrychleji dospívajícího
modelového obratlovce – halančíka tyrkysového
(*Nothobranchius furzeri*)**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/ZDRAVOTNÍ
LABORANT**

Autor: Magdaléna Landová

Vedoucí práce: Ing. Roman Franěk, Ph.D.

České Budějovice 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Vývoj gonád v průběhu životního cyklu nejrychleji dospívajícího modelového obratlovce – halančika tyrkysového (Nothobranchius furzeri)*“ jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 28.4.2022

.....

Landová Magdaléna

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Romanu Fraňkovi Ph.D. za všestrannou pomoc, množství cenných a inspirativních rad, podnětů, doporučení, připomínek a zároveň za velkou trpělivost s obdivuhodnou ochotou při konzultacích poskytnutých ke zpracování této práce.

Vývoj gonád v průběhu životního cyklu nejrychleji dospívajícího modelového obratlovce – halančika tyrkysového (*Nothobranchius furzeri*)

Abstrakt

Halančík tyrkysový se musel přizpůsobit nehostinným podmínkám, ve kterých žije, a to především vysychání tůní, které znamená jistou smrt. Životní sprint zástupců tohoto rodu je na vrcholu už v průběhu jednoho měsíce po vykulení, kdy jsou u obou pohlaví plně vyvinuty gonády, které produkují gamety. Tato rychlost si vybírá svou daň, jelikož již od třetího měsíce začínají gonády projevovat známky degradace a apoptózy zárodečných buněk. Úbytek zárodečné tkáně se s věkem zvyšuje. Byl vypracován popis vývoje a degradace pohlavních orgánů u samců, jejich chov a postup při rozmnožování. Pro vyhodnocení změn spojených se stárnutím byly využity především imunochemické metody, zaměřující se na navázání konkrétních protilátek proti cílovým epitopům a jejich vizualizace pomocí fluorescenční mikroskopie. Byly popsány i jednotlivé postupy zpracování tkání pro histologické preparáty, a to jak pro klasickou světelnou, tak pro fluorescenční mikroskopii.

Klíčová slova

Halančík tyrkysový, spermatogeneze, spermatogonie, spermatocyty, spermie, oogeneze, oogonie, oocyty, zárodečný epitel, apoptóza, degradace tkání

Gonadal development during the lifetime of the fastest maturing model vertebrate - turquoise killifish (*Nothobranchius furzeri*)

Abstract

Turquoise killifish had to adapt to the inhospitable conditions in which they live, especially drying temporal water bodies, which means certain death. The life sprint of the representatives of this genus is at its peak within one-month post-hatching, when both sexes have fully developed gonads and can reproduce. This rate comes with a high cost, as the killifish gonads begin to show signs of tissue degradation and germ cell apoptosis as early as three months post-hatching. Germ cell loss increases with age. A description of the development and degradation of the gonads in males and their breeding was elaborated. For the evaluation of aging-specific changes, immunochemical methods were used, focusing on the binding of specific antibodies against target epitopes and their visualization using fluorescence microscopy. Procedures for histological specimens have also been described, both for classical light and fluorescence microscopy.

Key words

Turquoise killifish, spermatogenesis, spermatogonia, spermatocytes, sperm, oogenesis, oogonia, oocytes, germinal epithelium, apoptosis, tissue degradation

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Halančík tyrkysový (<i>Nothobranchius furzeri</i>).....	9
2.1	Klasifikace	9
2.2	Geografické rozšíření a biotop druhu.....	9
2.3	Popis.....	10
2.4	Potrava	10
2.5	Životní cyklus	11
2.6	Rozmnožování	11
3	Buňka	12
3.1	Stavba buňky.....	12
3.2	Buněčný cyklus	12
3.3	Mitóza	14
3.4	Meióza.....	16
3.5	Smrt buňky	16
3.5.1	Apoptóza	16
3.5.2	Nekróza	17
4	Pohlavní soustava ryb	17
4.1	Samčí pohlavní systém.....	18
4.1.1	Spermatogeneze	19
4.2	Samičí pohlavní orgány.....	20
4.2.1	Oogeneze.....	21
4.3	Rozmnožování u ryb	22
5	Metody	23
6	Praktická část	24
6.1	Metodika	24
6.1.1	Chov a rozmnožování ryb	24
6.1.2	Zpracování vzorků pro rutinní histologii.....	27
7	Výsledky	34
7.1	Vývoj gonád.....	34
7.1.1	Vývoj samičích gonád.....	37
7.1.2	Vývoj samčích gonád	44
7.2	Apoptóza zárodečných buněk	56
8	Diskuze.....	59
9	Závěr	62

10	Bibliografie	64
11	Seznam obrázků	68

1 Úvod

Halančík tyrkysový je malá sladkovodní ryba žijící v tůních a napajedlech v Africe. Tato na první pohled obyčejná, ryba má ovšem jedinečný životní cyklus, musela se totiž přizpůsobit pravidelnému vysychání vodních ploch, ve kterých žije a dalším nehostinným podmínkám, jako jsou například predátoři. Období, kdy jsou malé toky v subtropických a tropických oblastech zavodněné, nebývají příliš dlouhé, a proto mají halančíci jen velmi málo času na to, aby po vykolení pohlavně dospěli a rozmnožili se, než dojde k jejich úhynu v důsledku vyschnutí. Pro zachování kontinuity druhu je zásadní, aby další generace halančíků byla připravena na svůj růstový sprint a opět dokázala založit novou generaci. Vyvíjející se embrya halančíků mají více než unikátní schopnost, jak se vypořádat s nehostinnými podmínkami Afriky. Embrya jsou schopna zastavit svůj vývoj, přečkat nepříznivé období sucha a po znovunaplnění tůně znovu nastartovat embryonální vývoj. Ačkoliv již byla popsána reprodukce halančíků v přírodě i v zajetí, tak stále nejsou dostupné žádný popis raného vývoje gonád, navzdory tomu, že halančík má potenciál se stát mimořádně významným modelovým obratlovcem nejenom pro výzkum stárnutí. Doposud se neví, kdy přesně přicházejí halančíci do puberty a v jaké míře zde probíhá pohlavní senescence.

2 Halančík tyrkysový (*Nothobranchius furzeri*)

2.1 Klasifikace

Říše: živočichové (Animalia)

Kmen: strunatci (Chordata)

Třída: paprskoploutví (Actinopterygii)

Řád: halančíkovci (Cyprinodontiformes)

Čeleď: halančíkovití (Nothobranchiidae)

Rod: halančík (*Nothobranchius*) (Jubb, 1971)

2.2 Geografické rozšíření a biotop druhu

Ryby z řádu Cyprinodontiformes žijí na tropických a subtropických kontinentech kromě Austrálie, v mírném pásmu se vyskytují velice zřídka. Kvůli svému výraznému zbarvení vyhledávají spíše kalné tůně (Polačik a Žák, 2018).

Přírodním biotopem halančíka tyrkysového jsou především řeky savan na území jižního Mosambiku, konkrétně od řeky Inkomati až po řeku Save. Některé populace můžeme najít i v řekách na území Zimbabwe. Halančík se ovšem nevyskytuje přímo v řekách, ale v tůních, které na řeky navazují, tyto toky jsou od sebe odděleny tak, že není možná migrace halančíka z jedné části do druhé díky čemuž je většina populací geneticky diverzifikována (Polačik a Žák, 2018). Halančík tyrkysový preferuje vodu o teplotě 20-30 °C, ovšem je schopný být aktivní i v širším rozmezí teplot vody 15-37 °C (Žák a Gvoždík, 2019).

Jako pro většinu menších toků je i pro tyto tůně typické periodické vysychání a opětovné zadržování vody. Toto nehostinné prostředí dalo vzniknout unikátní životní strategii halančíka, která má za následek specifický životní cyklus včetně jeho embryí, která procházejí diapauzou a jsou schopna přečkat i dlouhodobé vyschnutí (Žák a Gvoždík, 2019).

Přírodní biotop halančíků je ohrožený vlivem lidské činnosti, především těžbou a zemědělstvím, a to má za následek postupné zmenšování vodních ploch v celé oblasti (Žák a Gvoždík, 2019).

2.3 Popis

Halančík tyrkysový je sladkovodní ryba menšího vzrůstu, její velikost se v dospělosti pohybuje od 5 do 8 centimetrů. Halančík je znám svou krátkověkostí a rychlostí dospívání, díky čemuž se stal významným modelovým organismem ve výzkumu stárnutí. Poprvé byl popsán v roce 1971, informace o jeho objevu jsou však známy už z roku 1968 (Jubb, 1971).



Obrázek 1: Halančík tyrkysový

Zdroj: vlastní

Halančík tyrkysový má mírně horní postavení úst se 3-4 řadami ozubení. Typický pro tento druh je pohlavní dimorfismus, kdy jsou samci výrazně větší a zbarvenější než samice. Tělo samic má obvykle šedohnědé zbarvení bez výrazného vzorování, zatímco samci mají tyrkysové šupiny, které tvoří síťovou strukturu, hřbetní a řitní ploutve bývají obvykle mramorované. Podle barvy ocasních ploutví se rozlišují dvě barevné formy, a to černo červená a žluto černá. Prsní ploutve bývají obvykle žluté s mramorovanými okraji (Vítek a Kadlec, 2001). U divoce žijících populací je též znám velice vychýlený poměr pohlaví ve prospěch samic, především díky vysoké úmrtnosti samců (Vítek a Kadlec, 2001).

2.4 Potrava

Halančík tyrkysový je dravá ryba, která se živí nejčastěji bezobratlými živočichy, drobným hmyzem či pulci žab. V zajetí jsou obvykle krmeni larvami pakomárů či patentkou, nicméně je lze přivyknout i na umělou potravu (Polačik a Reichard, 2010).

2.5 Životní cyklus

Medián délky života je obvykle velmi krátký, udává se 3-7 měsíců, přičemž je tato délka závislá na množství vody v tůních a rychlosti vysychání. V zajetí je život halančíka a o něco delší, nejčastěji se udává 3-12 měsíců, přičemž většina se dožívá 4-6 měsíců (Valenzano et al., 2015). Délka života se odvíjí i od kmene, například nejkratší dobu žijící linie GRZ, která je inbrední se dožívá 2-4 měsíců, zatímco linie MZM-0410 se dožívá 7-9 měsíců, to z nich dělá nejdéle žijící linii halančíka tyrkysového (Žák et al., 2019).

2.6 Rozmnožování

Rozmnožování probíhá v páru u dna, samec pomocí hřbetní a řitní ploutve obejmě samici a přitlačí ji ke dnu. Během toho samice vypustí jednu jikru, která je samcem okamžitě oplozena. Další tření probíhá se stejným nebo s jinými samci. Samice denně vyprodukuje 20-120 jiker (Polačik et al., 2011). Další specifikem u halančíků je reprodukční senescence, to je pokles plodnosti s přibývajícím věkem. Obecně se neví, kdy přesně prochází halančíci pubertou, i když je známo, že rozmnožování mohou být schopni jedinci již ve věku 17 dní (Terzibasi Tozzini a Cellerino, 2020). Produkce vajíček se zvyšuje nejvíce mezi 17. a 30. dnem života, a pak je přibližně měsíc stabilní, poté začíná klesat. Nicméně je důležité mít na paměti, že ryby jsou poikilotermní živočichové, tudíž lze významně manipulovat s rychlostí růstu, nástupem reprodukce, ale i délkou života. Vztah produkce spermií s rostoucím věkem nebyl zatím analyzován (Valdesalici a Cellerino, 2003).

Oocyty halančíka tyrkysového mají elipsoidní tvar a jejich velikost se pohybuje obvykle od 1,1 do 1,3 mm v závislosti na velikosti samičky i dalších podmínkách. Na svém povrchu mají jemné chloupky, které slouží na ochranu embrya, stejně jako zesílený obal (chorion), které jsou v porovnání s ostatními druhy ryb až desetkrát silnější a je klíčový pro přežití bez vody (Polačik a Reichard, 2010).

Embryo halančíka je jedinou vývojovou fází, která je schopná přežít vyschnutí tůně a to tak, že během sucha přechází do diapauzy, tedy do stádia zastavení vývoje, toto období trvá až do znovu zavodnění tůně. Halančík se vylíhne z obalů v období, kdy je v tůních dostatek vody. Po vylíhnutí následuje období extrémně rychlého růstu a pohlavní dospělosti, kdy bylo prokázáno, že jedinci ve volné přírodě dospívají již 14 dní po vykulení. V případě chovu v zajetí je halančík schopný dospět již 17. den od vykulení (Žák et al., 2019).

3 Buňka

Buňka je základním stavebním kamenem všech živých organismů. Nejzákladnějším rozdělením buněk je na buňky eukaryotické a prokaryotické. Buňky se též rozlišují podle velikosti, zatímco ty nejmenší jsou v řádu několika málo mikrometrů (například spermie), ty největší dosahují velikost několika centimetrů (například vajíčko) (Alberts, 2004)

3.1 Stavba buňky

Prokaryotická buňka

Prokaryota mají nejprimitivnější buňky. Jejich obalem je buněčná stěna, ze které obvykle vystupují výběžky neboli brvy. Jejich nukleová kyselina není obalena a je v cytoplazmě volně. Prokaryotická buňka postrádá i vnitřní rozdělení pomocí membránových váčků. Často mají i bičík, který jim pomáhá v pohybu (Alberts, 2004)

Eukaryotická buňka

Eukaryotická buňka je druh buňky vyskytující se u eukaryot, to znamená, že jejich jádro je diferenciováno a odděleno od zbytku buňky. Typ eukaryotické buňky nalézáme jak u jednobuněčných organismů (například prvoků) nebo jako součást mnohobuněčných organismů a struktur. Mezi nejdůležitější orgány eukaryotické živočišné buňky patří jádro, mitochondrie, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum, cytoskelet a lysozomy (Alberts, 2004).

3.2 Buněčný cyklus

Aby daná populace organismů mohla přežít, je třeba replikovat genetickou informaci do další generace. U jednobuněčných organismů je replikace buňky sama o sobě tvořením nové generace, avšak u mnohobuněčných organismů je dělení buněk důležité i pro přežití daného organismu, jelikož je nutné nahrazovat buňky, které buď vstoupily do apoptózy nebo podlehly nekróze. Buněčné dělení je esenciální součástí celého buněčného cyklu (Alberts, 2004).

Buněčný cyklus se dělí do čtyř etap neboli fází, které na sebe postupně navazují. Těmito fázemi jsou: M-fáze, tedy samotné dělení buňky a interfáze, která se dělí na S-fázi, G₁ fázi a G₂ fázi. Po rozdělení buňky se cyklus znovu opakuje (Alberts, 2004)

Interfáze

Interfáze je fáze buněčného cyklu, ve kterém se duplikují vnitřní struktury buňky vyjma buněčného jádra. Tato fáze je obvykle delší než M-fáze, a to z důvodu, aby měla buňka dostatečný čas na zdvojení všech organel (Pollard et al., 2016).

G₁ fáze

G₁ fáze je první fází interfáze a navazuje na M-fázi. Během této fáze se duplikují všechny organely v buňce, dochází i k množení cytoplazmy. Na konci G₁ fáze je první kontrolní bod buněčného cyklu a ve chvíli, kdy se buňka dostane do tohoto bodu, nastane kontrola duplikace. Pokud buňka stihla zdvojnásobit všechny své organely, pokračuje do S-fáze, pokud ovšem z nějakého důvodu duplikaci nestihla, tento bod buněčného cyklu zastaví až do doby, než bude duplikace kompletní (Pollard et al., 2016).

S-fáze

Syntetická fáze je charakterizována jako syntéza DNA v jádře. Na konci této fáze jsou tedy dvě identické sady chromozomů. Na konci S-fáze se zdvojí i centrioly (Pollard et al., 2016).

G₂ fáze

Posledním stádiem interfáze je G₂ fáze, při které se dokončuje buněčná replikace. V této fázi se nachází druhý kontrolní bod, během kterého se kontroluje správné zdvojení genetické informace. Na tuto fázi navazuje M-fáze (Pollard et al., 2016).

M-fáze

M-fáze je fáze samotného rozdělení buňky. Aby vznikly dvě identické dceřiné buňky, je potřeba, aby všechny organely včetně jádra byly rozděleny rovnoměrně mezi tyto buňky. Nejdůležitější je ovšem rozdělení chromozomů, za to je odpovědné mitotické vřeténko, které je tvořeno převážně mikrotubuly. Během M-fáze vzniká také kontraktilní prstenec, který má za úkol táhnout plazmatickou membránu a tím rozdělit samotnou buňku (Pollard et al., 2016).

3.3 *Mitóza*

Mitóza je typ buněčného dělení, který dává vzniknout dvěma dceřiným buňkám. Skládá se z několika na sebe navazujících dějů: profáze, prometafáze, metafáze, anafáze a telofáze. Tyto děje popisují rozdělení sad chromozomů (Otová et al., 2008).

Rozdělení organel

Některých organel je v buňce velké množství, například mitochondrií. Během buněčného cyklu se jejich počet přibližně zdvojnásobí a poté se rovnoměrně rozdělí do dvou nově vznikajících dceřiných buněk. Co se týče ostatních organel, ty se obvykle rozpadnou na menší fragmenty, které jsou rozděleny a po ukončení buněčného cyklu se opět složí ve funkční jednotky. Fragmentace zvyšuje šanci na rovnoměrné rozložení organel do nově vznikajících buněk (Otová et al., 2008).

Profáze

Na začátku profáze se od sebe oba centrozomy oddělují a pohybují se na opačné póly buňky, tento pohyb probíhá podél mikrotubulů. Oba centrozomy mají vlastní svazek mikrotubulů, které spolu interagují za vzniku mitotického vřetenka, tím se z centrozomů stávají póly dělicího vřetenka (Otová et al., 2008).

Prometafáze

V okamžiku, kdy se jaderné laminy, což jsou sítě filament tvořící jadernou membránu, začnou rozpadat, začíná Prometafáze. Jaderný obal se rozpadne na malé membránové váčky, čímž umožní kontakt vřetenka s chromozomy. Mitotické vřetenko se naváže na chromozomy pomocí kinetochorů, které se nacházejí na centromerách. Tyto mikrotubuly se poté nazývají kinetochorové mikrotubuly (Otová et al., 2008).

Metafáze

Během metafáze se chromozomy přemístí do poloviny vzdálenosti mezi póly, která se nazývá ekvatoriální rovina, čímž vytvoří metafázovou destičku (Otová et al., 2008).

Anafáze

Anafáze začíná rozpojením sesterských chromatid v úrovni centromery, a tím je umožněn pohyb dceřiných chromozomů na opačné póly buněk. Samotná anafáze se dělí na dvě části, A a B. V průběhu anafáze A se kinetochorové mikrotubuly zkracují během depolymerizace, zatímco během anafáze B se oddalují samotné póly vřetenek. Tímto

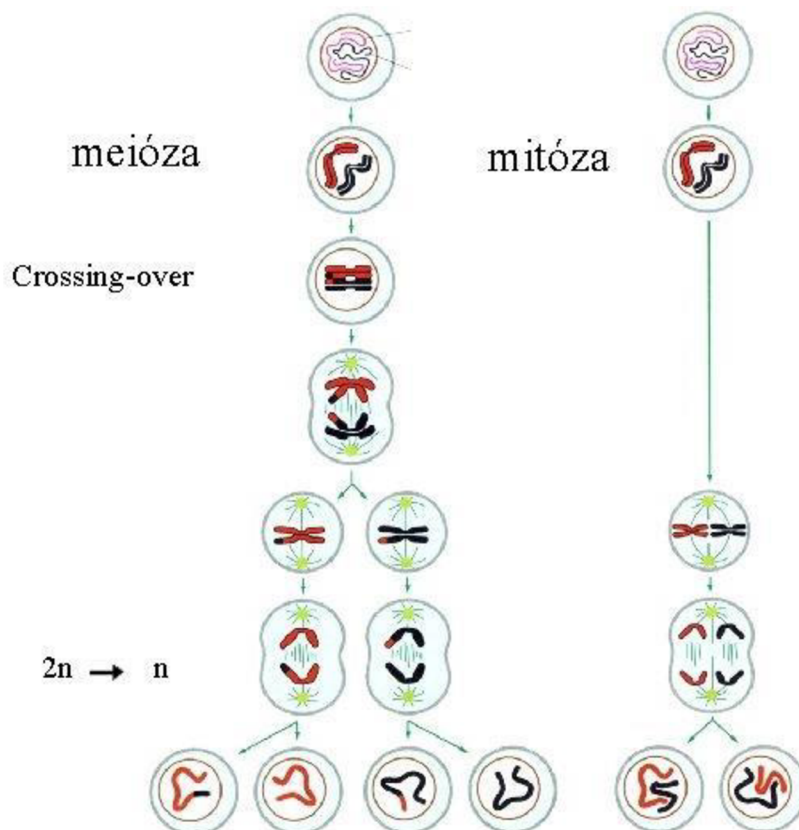
rozdělením nám tedy vznikají dvě identické sady na dvou pólech vřeténka (Otová et al., 2008).

Telofáze

Po oddělení chromozomů je potřeba opět okolo nich vytvořit jadernou membránu, ta vzniká v průběhu telofáze. Jaderná membrána vzniká spojováním membránových materiálů, během čehož dojde k opětovnému vytvoření jaderné laminy. Po znovuvytvoření jaderného obalu mohou chromozomy dekondenzovat a je obnovena transkripce DNA. Tímto končí celý proces mitózy (Otová et al., 2008).

Cytokineze

Posledním úkolem buňky je se rozdělit na dvě dceřiné buňky. První známky cytokineze pozorujeme již v anafázi, kdy se buněčná membrána svažuje a utvoří se počáteční rýha. Tento žlábek je kolmý k podélné ose mitotického vřeténka. U živočišných buněk probíhá rozdělení pomocí kontraktálního prstence, kdy jsou buňky od sebe odděleny od kraje ke středu pomocí zaškrcování (Otová et al., 2008).



Obrázek 2: Porovnání meiózy a mitózy

Zdroj: (Alberts, 2004)

3.4 Meióza

Výše popsané dělení probíhá u všech diploidních buněk v těle, tedy u těch, které mají dvě sady chromozomů. Pohlavní buňky ovšem musí být haploidní, aby po jejich splnutí vznikla diploidní zygota. Dělení, jehož výsledkem je buňka haploidní, říkáme meióza. Jde o dvojitý buněčný dělení, kdy při prvním probíhá crossing-over homologních chromozomů (Pollard et al., 2016).

První meiotické dělení

Dochází k replikaci chromozomů za vzniku sesterských chromatid, ovšem před rozpadem jaderného obalu se každý chromozom spáruje se svým homologem, při čemž vzniká bivalent. Bivalent obsahuje čtyři chromatidy a dochází zde ke crossing-overu, tedy výměně některých částí chromozomů mezi sebou (Pollard et al., 2016). Výsledkem jsou tedy dvě buňky, jejichž DNA pochází vždy pouze z jedné sady chromozomů (Alberts, 2004).

Druhé meiotické dělení

Při druhém dělení nedochází k replikaci DNA. Dělení probíhá klasicky jako u mitózy, vzniká vřeténko, chromozomy se skládají do ekvatoriální roviny a poté se rozcházejí. Výsledkem jsou tedy další dvě buňky, tedy z jedné původně diploidní buňky vznikají čtyři buňky haploidní (Pollard et al., 2016).

3.5 Smrt buňky

Každá buňka v těle má svůj životní cyklus, ovšem ten vždy musí nějakým způsobem skončit, pokud by tomu tak nebylo, mohla by se buňka stát nádorovou. Obecně rozdělujeme možnou smrt buňky na dva druhy, smrt fyziologickou neboli apoptózu a patologickou, tedy nekrózu (Alberts, 2004).

3.5.1 Apoptóza

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt, je označení pro fyziologickou smrt buňky. Tento proces obvykle buňka vyvolá sama, a to ve chvíli, kdy je nepotřebná nebo poškozená. V momentě, kdy buňka spustí signály pro apoptózu, je aktivován celý soubor proteáz, tedy enzymů, které štěpí další proteiny. Tyto enzymy aktivují další soubory enzymů a tím podporují proteolytickou kaskádu (Alberts, 2004).



Obrázek 3:
Apoptotická buňka
Zdroj (Alberts, 2004)

Nejdříve se začne buňka smršťovat, poté se na membráně vytvoří váčkovité struktury tvořené aktinem a forinem, pak začne buňka do okolí vydávat signály pro ostatní buňky, aby ji samou fagocytovaly, to způsobuje fosfatidylserin. Mitochondriální membrána začne uvolňovat cytochrom a jedním z posledních procesů je karyorrhexe neboli štěpení DNA na malé úseky, to má za příčinu rozpad jádra. Nakonec se celá buňka rozpadne na malá apoptotická tělíska, která jsou fagocytována okolními buňkami, díky tomu nezpůsobuje zánět, čímž se výrazně liší od nekrózy (Alberts, 2004).

3.5.2 Nekróza

Nekróza je patologickou buněčnou smrtí, je obvykle vyvolána vnějšími podmínkami, například infekcí, ale i fyzikálními a chemickými podněty, jako třeba teplem nebo kyselinami. Buňka se na rozdíl od nekrózy přeplyňuje vodou, tím zvětšuje svůj objem, až do okamžiku, kdy buněčná membrána praskne a obsah se vylije do okolí. Tímto vylitím obvykle způsobí zánětlivou reakci ve svém okolí a poničí okolní struktury (Alberts, 2004).

4 Pohlavní soustava ryb

Stejně jako u většiny obratlovců je i pohlavní soustava u ryb dělena na dvě samostatné skupiny podle pohlaví, a to na samčí a samičí, které jsou morfologicky rozdílné. Hlavní funkcí pohlavního systému je rozmnožování, u ryb jsou ovšem způsoby rozmnožování velmi rozmanité, což je dáno celkovým množstvím druhů, které přesahuje 36000 a skutečností, že ryby obývají všechny zeměpisné šířky. I přes to, že většina druhů ryb jsou gonochoristé, tedy mají oddělená pohlaví, existují i druhy hermafroditní, tedy oboupohlavní, jejich zástupci jsou například zástupci čeledi Serranidae. Podobně na dvě skupiny rozdělujeme i způsob oplození na vnější, které probíhá mimo tělo a je častější a na vnitřní, které probíhá uvnitř těla a je u ryb velmi vzácné (např. živoročky) (Dvořák et al., 2020).

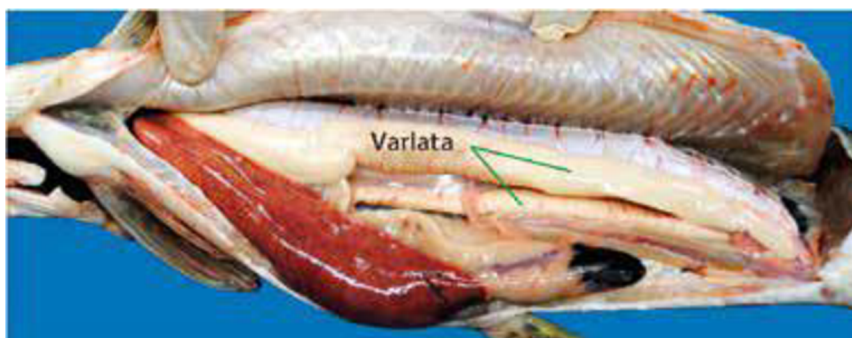
Pohlavní žlázy jsou obvykle párové, s výjimkou okouna říčního, u kterého srůstají v jeden celek a nacházejí se v horní polovině tělní dutiny podél vnějších okrajů ledvin a po stranách plynového měchýře. U samců se pohlavní žlázy nazývají varlata neboli testes, samice mají vaječníky neboli ovaria. Vývody pohlavních žláz se vyskytují mezi řití a řitní ploutví a mohou vyústit buďto samostatně nebo společně s močovým systémem na urogenitální papile (Dvořák et al., 2020).

4.1 Samčí pohlavní systém

Testes se nacházejí podél plynového měchýře, a ačkoliv se stavbou liší od pohlavních orgánů vyšších obratlovců, mají i společné rysy, a to semenotvorné kanálky, které spojuje vmezežené vazivo. Mají dvě hlavní funkce, první funkcí je funkce generativní, to je tvorba pohlavních buněk a funkce endokrinní, tedy produkce pohlavních hormonů (Dvořák et al., 2020).

Varlata se skládají ze dvou částí: intersticiální a tubulární. Mezitubulární prostor vyplňují Leydigovy buňky, krevní a lymfatické cévy, buňky imunitního systému, nervové buňky a pojivová tkáň. Tubulární část obsahuje bazální membránu a je zde zárodečný epitel spolu se Sertoliho buňkami, pokud jsou zárodečné buňky neaktivní mohou přežít pouze v těsné blízkosti právě Sertoliho buněk. Hlavní rozdíly s vyššími obratlovci (Tetrapoda) jsou ve spermatogenních tubulech, které u ryb tvoří jednotlivé spermatocysty, jenž obsahují zárodečné buňky, které se v rámci jedné cysty vyvíjejí synchronně a pocházejí z jedné společné spermatogonie. Další rozdílem oproti vyšším obratlovcům je zachování proliferační schopnosti Sertoliho buněk u dospělých ryb, a to umožňuje kontinuální růst testes i po dosažení pohlavní dospělosti. Počet Sertoliho buněk se u ryb dynamicky mění v závislosti na rozmnožovacím cyklu. Naopak u savců je předpokládáno, že počet Sertoliho buněk založených v průběhu puberty je definitivní a během života dále nenarůstá (Schulz et al., 2010)

Pohlavně zralá varlata mají mléčnou barvu, oválný tvar a průřez se může lišit podle uspořádání ostatních vnitřních orgánů. Jejich velikost se zásadně liší v závislosti na pohlavní aktivitě. V době rozmnožování jsou varlata několikrát zvětšená a představují velkou část váhy těla, a to až 10 %. Testes jsou složena převážně z parenchymu a centrálního kanálku. Do centrálního kanálku vyústují postranní kanálky a váčky, v nichž vznikají spermie, které se vyvíjejí ze spermatogonií. Spermie se musí z varlat dostat do *sinus urogenitalis*, to umožňují *ductuli efferentes testis*, vývody oddělené od močových cest, které se spojují v chámovod, ten ústí buď samostatně nebo s močovými cestami (Dvořák et al., 2020).



Obrázek 4: Testes porcelánové barvy v dutině břišní
Zdroj: (Dvořák et al., 2020)

Spermie u ryb jsou tvořeny hlavičkou, krčkem a bičíkem. Velikost spermií se zásadně liší podle druhu, ale i přes to patří mezi nejmenší buňky v těle. Dokud jsou spermie v těle samce nejsou pohyblivé, pohybovat se začnou až v okamžiku, kdy se dostanou do vodného prostředí. Pohyblivost spermií je krátká, udává se od 25 (Pstruh obecný) až po 300 sekund (jeseteři). U mořských druhů ryb může doba pohyblivosti být až 10 minut (Cosson et al., 2008). Inaktivované spermie přežívají nejdéle v suchém a chladném prostředí, v podmínkách okolo 0 °C jsou schopné přežít v několik dní v závislosti na druhu (Dvořák et al., 2020).

4.1.1 Spermatoogeneze

Spermatoogeneze je vývoj samčích pohlavních buněk, tyto buňky se vyvíjejí ze spermatogonií, které vznikly diferenciací primordiálních gonocytů. Spermie je haploidní buňka, má pouze jednu sadu chromozomů, ovšem původní spermatogonie je diploidní, má dvě sady chromozomů, je tedy potřeba meiotického neboli redukčního dělení. Spermatoogeneze je přímo závislá na funkci Sertoliho a Leydigovo buněk, které jsou stimulovány gonadotropiny, luteinizačním hormonem i folikuly-stimulující hormonem. (Xie et al., 2020)

Samotná spermatoogeneze je u všech živočichů obdobná, spermatogonie mitoticky proliferují, probíhá meiotické dělení, a nakonec vzniká spermie, která v sobě nese samčí genetický kód. U teplomilných ryb trvá spermatoogeneze obvykle kratší dobu, například u dáňáka pruhozaného je délka spermatoogeneze (tj. čas od vzniku spermatogonie do vzniku spermie) přibližně 7 dní (Leal et al., 2009), zatímco u člověka 63 dní (Leal et al., 2009), avšak je tu velké množství aspektů, mezi nejdůležitější patří teplota vody, která může spermatoogenezi u ryb výrazně zrychlit, zpomalit, ale i úplně zastavit, jako bylo například prokázáno na modelu tilápie nilské. (Xie et al., 2020)

Spermatogenezi můžeme rozdělit do 3 fází: mitotické, kdy se nám vyskytuje více různých generací spermatogonií, dále pak meiotickou, kdy vznikají spermatocyty a spermatidy a na závěr fáze spermiogenní, kdy se již haploidní buňky diferencují ve spermie (Dvořák et al., 2020).

Mitotická fáze zahrnuje dělení kmenových spermatogonií a jejich postupnou diferenciaci na primární spermatocyty. Tyto buňky jsou stále diploidní a jejich stáří se liší. V meiotické fázi vstupuje primární spermatocyt do prvního meiotického dělení a vzniká sekundární spermatocyt. Sekundární spermatocyt poté podléhá druhému meiotickému dělení a výsledkem jsou 4 spermatidy s jednou sadou chromozomů. Poslední fází je diferenciaci ve spermie, tedy spermiogeneze. Nejzásadnější je vývoj bičíku a kondenzace jaderného chromatinu. Dále se mění velikost a tvar jádra a tvoří se mnoho proteinů specifických pro spermie (Dvořák et al., 2020).

4.2 Samičí pohlavní orgány

Samičí gonády se nazývají vaječníky neboli ovaria a jejich hlavním úkolem je produkce samičích pohlavních buněk – oocytů. Ovaria se nacházejí v tělní dutině, avšak jejich tvar i velikost se velmi liší podle druhu, fáze dozrávání oocytů a rozložení ostatních vnitřních orgánů. Vaječníky jsou rozděleny přepážkami, které jsou vazivového charakteru, tyto přepážky jsou obvykle stavěny napříč. Vajíčka neboli jikry, putují po dozrání primitivním vejcovodem. Vejcovod se utváří srůstem peritoneálních struktur, které obklopují vaječníky. Ryby se dělí do dvou skupin, ty, které uvolňují jikry do vejcovodů, se nazývají cystovarijní, zatímco ty, které uvolňují jikry přímo do tělní dutiny jsou gymnovarijní (Dvořák et al., 2020).



Obrázek 5: ovaria jasně žluté barvy
Zdroj: (Dvořák et al., 2020)

Vajíčka ryb, stejně jako u většiny obratlovců, jsou největší buňky v těle. Velikost i tvar jiker se výrazně liší, stejně jako u ovarii, podle druhu ryby, ale jsou zde i další faktory. Obecně ale platí, že čím méně péče o mláďata, tím více jiker menší velikosti ryba vyprodukuje. V souhrnu lze říct, že jikry mají obvykle kulovitý tvar a obsahují enormní množství žloutku (Dvořák et al., 2020). Barva jiker je závislá na druhu, množství i kvalitě potravy a celkovému zdravotnímu stavu. Nejběžnější barvy jsou od oranžové, přes žlutou až k zelené barvě (Dvořák et al., 2020).

Jikry jsou pokryté žloutkovou blánou (membrána *vitellina*), neboli obalem prvního stupně, v průběhu oogeneze je navíc každý oocyt obalen vrstvou folikulárních epiteliálních buněk, z této vrstvy vzniká chorion neboli obal druhého stupně, který vytváří *zonu pellucidu*. To je prostor oddělující folikul od jikry. Aby spermie mohla proniknout do jikry je potřeba, aby v ní byl otvor (mikropyle), u ryb je obvykle jen jeden, kromě jeseterovitých, kde jich bývá zpravidla více. Vajíčka kostnatých ryb označujeme za telolecitální, kdy je žloutek soustředěn pouze na vegetativním pólu (Dvořák et al., 2020).

Při kontaktu s vodou začne vajíčko nasávat vodu díky polopropustným vaječným obalům, tím začne bobtnat a zvětšovat svůj objem. Chorion začne tuhnout díky enzymům v perivitellinímu prostoru, čímž zastaví nasávání vody a uzavřou se mikropyle, tím se zároveň ukončuje možnost oplození jikry spermií (Dvořák et al., 2020).

4.2.1 Oogeneze

Oogeneze je tvorba a diferenciací samičích pohlavních buněk, vajíček. Vajíčka jsou haploidní buňky, tedy s jednou sadou chromozomů a jsou to největší buňky v těle. Oogeneze probíhá ve vaječnicích a nejdůležitější hormony regulující oogenezi jsou estrogen, luteinizační hormon a folikuly stimulací hormon (Domínguez-Castanedo a Uribe, 2019)

Zatímco finální produkt oogeneze u ryb, tedy vajíčko, může mít napříč druhy mít velmi rozdílné charakteristiky, především rozdíly ve velikosti, barvě a tloušťce obalů. Základním pojítkem je vždy to, že celý proces probíhá ve folikulech vaječníků a má několik fází, které jsou velice podobné s fázemi spermatogeneze, především mitotická proliferace diploidních oogonií dvěma cykly meiózy. Zásadním rozdílem oproti spermatogenezi je, že v průběhu oogeneze dochází k zásadnímu zvětšování buněk (Lubzens et al., 2010).

První fází je mitotického dělení. Z primordiálních gonocytů se diferencují oogonie, které podléhají mitóze a následně vstupují do první fáze meiózy, kdy vzniká několik stovek až tisíc oocytů prvního řádu, jejichž vývoj se zastavuje v profázi až do momentu pohlavního dospívání. Poté přichází fáze zrání, kdy se primární oocyt mění na sekundární oocyt. Tedy dochází k prvnímu meiotickému dělení. V jádře se začíná tvořit dělicí vřetenko a postupně mizí jaderná membrána. V prvním zrání se odděluje sada chromozomů a společně s cytoplazmou vytvoří primární pólocyt, který opouští prostor oocytu. Navazuje druhé zrání, které je stejně jako u primárního oocytu zastaveno v metafázi. Druhé zrání je opět nastartováno pouze v případě oplození, kdy se opět oddělí část chromozomů a cytoplazma za vzniku sekundárního pólocytu (Lubzens et al., 2010).

4.3 Rozmnožování u ryb

Gonochismus je základní model rozmnožování u ryb, kdy obě pohlaví existují odděleně. Podle místa oplození rozdělujeme druhy na oviparní, kdy oplození probíhá ve vnějším prostředí a ovoviviparní, kdy k oplození probíhá v pohlavních orgánech samice (Devlin a Nagahamab, 2002). Podmínkou pro výtěr ryb je dobrý zdravotní stav a vhodné prostředí, vnitřní i vnější. Podle teploty vody můžeme rozdělit druhy na ty vytírající se po studené periodě s nástupem oteplení, patří sem například štika obecná, okoun říční, candát obecný, kapr obecný a další. Druhým typem jsou druhy vytírající se se snižující se teplotou vody, sem spadá například pstruh obecný, siven americký, mník jednovousý a další (Sundararaj, 1981).

Podle cykličnosti výtěru se druhy rozdělují na monocyklické, kdy výtěr probíhá jednou za život a poté hynou, například úhoř říční a losos obecný (Gruzdeva et al., 2013) a polycyklické u kterých výtěry probíhají několikrát za život např. kapr obecný (Sivakumarana et al., 2003). Ryby se mohou rozmnožovat jen s jedním partnerem, tudíž se jedná párový výtěr, anebo může tření probíhat ve skupině, tedy skupinovým výtěrem. Jikry jsou kladeny do písku, šterku nebo na kameny, v případě litofilního výtěru, na rostliny v případě výtěru fytofilního a psamofilní výtěr probíhá na písčité dno. Samozřejmě jsou i druhy které nejsou náročné na přítomnost specifického výtěrového substrátu, v takovém případě mluvíme o indiferentním výtěru, který je typický například u plotice obecné (Balon, 1975).

5 Metody

Histologie patří mezi klasické techniky, které se používají ke studiu morfologie buněčných a subbuněčných struktur pomocí tenkých řezů z připraveného vzorku. Histologické techniky jsou důležitým nástrojem pro pochopení vývoje tkáně a adresování fenotypů a popisu patologických stavů. V závislosti na typu analýzy a vlastního zpracování je dostupné mnoho histologických technik, mezi ty nejběžnější patří zamražení neboli kryoembedding, parafinové a pryskyřicové zalévání (Leal et al., 2009).

Základní metoda pro pozorování histologických preparátů je světelná mikroskopie, v dnešní době se ale už začíná hojně využívat i elektronová mikroskopie. Vzorkem pro histologii jsou nejčastěji homogenní tkáně, jako jsou části orgánů a nádorů, mohou to být ale i celé organismy. Samozřejmě pro prosvícení se musí vzorky nakrájet na mikrořezy o tloušťce 1-10 μm , k tomu jsou nejčastěji využívány sáňkové nebo rotační mikrotomy a kryostaty. U většiny technik je potřeba nejdříve vzorek zafixovat, k tomu je nejčastěji využíván aldehyd kyseliny mravenčí, formaldehyd, optimální fixace trvá 24-48 hodin. Aby bylo možné zhotovit tenké řezy je nutné vzorek prosytit zalévacím médiem, nejčastěji parafinem. Parafin se ovšem nemísí s vodou a je tedy nutné vzorky odvodnit ethanolem, který je později ve tkáni nahrazen xylenem (Carneiro a Junqueira, 1997). Pro zvýraznění a diferenciaci struktur je důležité řezy obarvit. Struktury, které se barví bazickými barvivy nazýváme bazofilní a jedná se o jádro a ribozomy. Struktury, které se barví kyselými barvami jsou acidofilní a jedná se o cytoplazmu a myofibrily. Konečným stádiem je montování, které zabraňuje znehodnocení preparátu. Řez se zakapává montovacím médiem a zakryje se krycím sklem. Tím vzniká preparát připravený ke čtení pod mikroskopem (Horký a Čech, 2007).

Zalévání do parafinu je vhodné pouze pro homogenní struktury, pokud je vzorkem tvrdá tkáň například zuby, anebo celé organismy včetně kosterních tkání, využívá před samotným zalitím vzorku dekalifikace, popřípadě se dá využít zalévání do pryskyřice. Zalévání do pryskyřice umožňuje zpracovávat i velmi tvrdé tkáně s možností tvorby ultratenkých řezů. Pro zalévání do pryskyřice se využívají dva druhy pryskyřice, epoxidová a akrylová. Epoxidová pryskyřice má dobré řezné vlastnosti, tvrdne rovnoměrně a je stabilní pod elektronovým mikroskopem, je tedy ideální pro ultrastrukturální pozorování. Akrylová pryskyřice má nízkou viskozitu a je mísitelná

s vodou, kvůli své menší toxicitě než u epoxidových pryskyřic je častěji využívána, a to i pro elektronovou mikroskopii (Magaki et al., 2019).

Příprava histologického pryskyřicového vzorku pro čtení probíhá velice podobně jako u parafínu, avšak jako fixační činidlo se zde používá často glutaraldehyd. Postup je dále stejný jako u zalévání do parafínu, až do momentu infiltrace, kde je zde alkohol nahrazen pryskyřicí. Pryskyřice musí být připravena před použitím. Po infiltraci se vzorky vkládají do pece kvůli vytvrzení a před řezáním je možné nadbytečnou pryskyřicí ořezat. Na řezy vzorků je vhodnější použít diamantové nebo skleněné nože, jelikož jsou pevnější a ostřejší, ale lze použít i ocelové (Parra et al., 2017).

Kryoembedding se obvykle používá v případech, pokud je výsledek potřeba co nejrychleji, nebo pokud je cílová tkáň citlivá na fixaci, při kryoembeddingu totiž není nezbytně nutné vzorky fixovat. Kryoembedding zachovává tkáň co nejvíce v přirozeném stavu a příprava tkáně není časově, vzorek se po odebrání zamrazí v tekutém dusíku nebo isopentanem na suchém ledu, zamražení isopentanem je využíváno častěji, jelikož je zde menší pravděpodobnost tvorby ledových krystalů, které nám vzorek znehodnocují (Murata a Wolf, 2018).

Vzorky se poté uchovávají při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do zpracování. Před krájením se vzorky nechávají v kryostatu vytemperovat na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu nejméně jedné hodiny. Kryo vzorky se obecně hůře krájí, kvůli horší konzervovanosti než například u parafínu. Po zamontování na sklíčko se sklíčko opět zamrazí na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, dokud se nebudou odečítat. Rizikem kryoembeddingu je špatné zachování buněčné morfolgie, která může být poničena procesem zamrazování (Murata a Wolf, 2018).

6 Praktická část

6.1 Metodika

Pro moji bakalářskou práci bylo zpracováno celkem 271 ryb v období od vykulení až do 7 měsíců. Pro výzkum vývoje gonád to bylo 259 ryb a pro detekci apoptózy celkem 12 ryb.

6.1.1 Chov a rozmnožování ryb

Halančík tyrkysový je díky svému rychlému růstu, dospívání, ale především extrémní krátkověkosti nedávno zavedeným laboratorním modelem. Chov halančíků je poměrně

náročný, a to především kvůli jejich potřebě vysoké kvality vody i potravy. (Polačik et al., 2016)

Jsou známy tři různé druhy inkubace embryí: ve vodním médiu, na vlhkém substrátu a uvnitř něj, při čemž se jako substrát nejčastěji používá rašelina. Každá z metod má svá specifika v podobě rychlosti vývoje embryí a různé mortalitě embryí v průběhu inkubace. Embrya, které nenecháme projít diapauzou (respektive jim specifickým režimem nedovolíme do diapauzy vstoupit) mají tendenci rychleji dospívat, ale i umírat než ty, které projdou diapauzou. Halančiky se doporučuje chovat v tvrdší vodě, tedy ve vodě s vyšším obsahem vápenatých a hořečnatých solí, a s alkalickým pH. V měkčí vodě jsou náchylnější k infekcím. Teplota vody by se měla udržovat na 28 °C, čím vyšší teplota tím vyšší požadavky na potravu a tím se i zrychluje znečišťování vody. Krmení je jedním z hlavních faktorů, které podmiňují úspěšný chov, nejčastějším přístupem je krmení ad libitum, tedy neomezené. V současné době stále není k dispozici umělá potrava specificky navržená pro halančiky, a proto se stále používá mražená nebo živá potrava, u níž je problém kontrola bezinfekčnosti (Polačik et al., 2016). Nicméně bylo prokázáno, že halančiky lze s úspěchem držet na umělé potravě používané pro jiné druhy ryb (Žák et al., 2020). Podmínky chovu, co se týká akvárií a jejich vybavení, nejsou náročné. Halančiky je možné chovat je pohromadě ve skupině, kdy je lepší chovat skupiny stejného stáří. Při individuálním chovu je nutné zajistit přemísťování ryb mezi jednotlivými akvárii za účelem tření, a to aspoň dvakrát týdně (Polačik et al., 2016).

Chov ryb pro účely produkce embryí je možný buď ve skupině nebo v párech. Pro naše účely byl použit chov ve skupině, kdy je důležité pravidelně sbírat oplozená vajíčka, případně vyvíjející se embrya, aby nedocházelo k jejich napadení plísní v důsledku dlouhého setrvání v neošetřeném substrátu a přítomnosti dospělých ryb. Na místo pro tření ryb se využívá skleněná nádoba naplněná převařenou rašelinou asi do 1/3 objemu, ideálně poslouží zavařovací sklenice. Sklenice se doplní vodou z akvária a po usazení rašeliny se opatrně umístí do akvária. Vhodná hustota ryb v akváriu je jedna ryba na 4 l vody při poměru pohlaví 3:1 (samice: samci). Ryby při tření vyhazují rašelinu z nádoby, tuto rašelinu je nutná odstraňovat, aby nedocházelo ke tření mimo nádoby. Nádoba s oplozenými vajíčky se vyjme z akvária a rašelina se vymačká přes síťku s jemnými oky, dokud z ní neodkape většina vody. Poté se rašelina přendá na filtrační papír a nechá se vyschnout na požadovanou vlhkost, vysychání obvykle trvá 2-4 dny. Provádí se kontrola úspěšnosti výtěru, a to hledáním embryí v objemu zhruba 150 ml rašeliny, na první

pohled, by mělo být vidět alespoň několik kusů embryí. Po vyschnutí je rašelina je přendána do uzavíratelného sáčku, který se popíše datem odběru, šarží, ID kmene a přibližný odhad počtu embryí v rašelině (vysoký, střední, nízký). Sáčky se ukládají do inkubátoru temperovaném na 17-25 °C, pokud chceme urychlit vývoj embryí může se teplota zvednout až na 28 °C. Ideální teplota pro navození diapauzy u embryí je 17-20 °C na 4 týdny a poté 25-26 °C na dalších 4-6 týdnů, čímž dosáhneme ukončení diapauzy u většiny inkubovaných embryí. Během diapauzy je důležité sáčky s rašelinou několikrát zkontrolovat a v případě, že rašelina ztrácí svůj tmavě hnědý odstín je třeba ji lehce navlhčit nebo případně při vysoké vlhkosti přidat rašelinu suchou (Polačik et al., 2016).

U našeho chovu se ryby vytíraly do rašeliny a embrya v ní byla ponechána po celou dobu inkubace. Oplozená embrya je třeba průběžně kontrolovat, zdravá embrya jsou průhledná bez zjevných struktur, avšak pokud mají mléčnou barvu, jsou embrya mrtvá. Je třeba dbát na to, aby embrya nebyla na vzduchu příliš dlouho, mohlo by dojít k jejich vysušení. Je třeba embrya průběžně kontrolovat, ve chvíli, kdy se objeví zlaté pigmentování duhovek jsou embrya připravená k líhnutí. Pokud potřebujeme pro experimentální účely konkrétní počet jedinců, je vhodné počítat s přibližně dvojnásobným počtem embryí nasazených na vykolení z důvodu ztrát v průběhu raného odchovu. Životaschopnost embryí v rašelině má omezenou dobu, která je závislá na inkubační teplotě. Žloutkový váček se po dosažení zlatého pigmentování duhovky začíná zmenšovat, a proto se nedoporučuje líhnout embrya déle než 2 měsíce od dosažení předlíhnuoucího stádia. (Polačik et al., 2016).

Embrya se ponechala ve vytírací rašelině z výtěrového akvária, která byla přendána do inkubačního akvária, spolu s další rašelinou a vodou, kulení probíhalo ve chvíli, kdy většina embryí měla zlatě pigmentované oko. V inkubačním akváriu by neměla být vrstva rašeliny vyšší než 2 cm a vrstva vody nad rašelinou by neměla být vyšší než 3 cm. Před vložením rašeliny s embryi je třeba rozmělnit větší shluky rašeliny promnutím mezi prsty a několikrát ji promíchat, aby došlo k dokonalému uvolnění vzduchu z rašeliny, který by mohl způsobit plavání embryí na povrchu hladiny, a to by vedlo k jejich znehodnocení. Čerstvě vylíhnutí halančici vykazují silnou touhu dosáhnout hladiny, aby mohli polknout bublinu vzduchu a naplnit si plynový měchýř. Z toho důvodu je vhodné naklonit inkubační akvárium, aby na jedné straně byla snížená hladina vody. Teplota vody pro zalití rašeliny by měla být 15 °C, jelikož nižší teplota stimuluje k okamžitému líhnutí halančiků. Voda by se následně měla postupně ohřát až na 25 °C. Kvůli riziku ztrát ryb, z důvodu nenaplnění vzduchového měchýře je vhodné do vody, kterou se zalívá rašelina,

přidat rozdrčené kyslíkové tablety, v množství, které je udáno výrobcem. Pozdější přidání tablet se ukazuje jako neúčinné (Polačik et al., 2016).

Nově vylíhlé ryby se nechávají v líhnocím akváriu po dobu 3-4 dnů, aby se minimalizovala manipulace s křehkými rybami. Po 24 hodinách od líhnutí se může akvárium vrátit do vodorovné polohy. Každý den se přidává 100% objem počátečního objemu vody, kvůli zachování její kvality, respektive aby došlo k dostatečnému naředění vyprodukovaných metabolitů ryb. K prvnímu krmení se používají nauplia žábronožky solné (*Artemia spp*) minimálně třikrát denně. Po 3-4 dnech se ryby mohou přesunout do nového akvária přelitím vody z původního akvária, při čemž je třeba přenést co nejméně rašeliny. Rašelina, který zbyla v líhnocím akváriu se vysuší a poté zkontroluje kolik obsahuje nevyvíhlých embryí. Pokud je jejich množství vysoké, dá se rašelina opět do inkubátoru a postup kulení se opakuje za 2-3 týdny (Polačik et al., 2016).

Při výměně vody je nutné dolévat vytemperovanou vodu, aby nedošlo k teplotnímu šoku. Krmit by se mělo třikrát denně, od 10. dne se může přidávat patentka nakrájená na malé kusy, postupně se může zvyšovat jak její objem, tak velikost. Vždy po dvou hodinách by se měla nespoteřovaná potrava vysát z akvária, aby nedocházelo ke zhoršení kvality vody v důsledku nespoteřované potravy (Polačik et al., 2016).

Pokud by se do chovu přidávaly nové ryby či embrya je třeba je na 30 dní umístit do karantény. Ta se skládá z dezinfikované a izolované nádrže a pro manipulaci s nimi se musí používat vyhrazené vybavení. Je třeba ryby každý den sledovat a v případě podezření na problém vyhledat odborníka, z introdukce volně žijících ryb hrozí nejčastěji zavlečení parazitárních infekcí, ovšem většina parazitárních infekcí halančiků není hrozbou pro ostatní ryby kvůli jejich specifickému a složitému vývojovému cyklu (Polačik et al., 2016).

6.1.2 Zpracování vzorků pro rutinní histologii

Jedinci halančiků ve věku od 0 dní po vykulení až po 10 měsíců po vykulení byly pro účely fixace vystaveny předávkování anestetikem (MS222) o dávce 1 g na 1 L vody po dobu 5 minut. V závislosti na velikosti byly jedinci fixováni vcelku (stádia do 4 týdnů věku), případně pouze vyjmuté gonády. Pro fixáž byl v použit roztok 4 % paraformaldehydu ve fosfátovém pufru (PBS) s pH 7,4, nebo Bouenův roztok. V závislosti na velikosti jedinců probíhala fixáž 4-24 hodin. Vzorky byly následně

převedeny do 70 % etanolu v destilované vodě a několikrát propláchnuty a následně uchovány v 4 °C až do zpracování (Sulliwán-Brown, 2011).

Pro zpracování řezů byly vzorky zality do resinu (JB4) dle částečně modifikovaného protokolu (Sulliwán-Brown, 2011).

1. Dehydratace vzorku ve 96 % a 100 % etanolu (3x po dobu 10-120 minut v závislosti na velikosti vzorku)
2. Infiltrace vzorku v JB4 médiu (2x po dobu 120 minut) a následná infiltrace přes noc.
3. Zalití vzorku do JB4 média, jeho orientace a následné vytvrzení ve vakuu po dobu 24 hodin.

Vzorky byly následně krájeny na mikrotomu o tloušťce řezu 3-5 μm . Individuální či sériové řezy byly následně pinzetou přeneseny a nataženy na superfrost sklíčko s destilovanou vodou a umístěny na plotýnku o teplotě 60 °C. Po 24 hodinách byly řezy barveny hematoxylinem a eosinem modifikovaným protokolem dle Sulliwán-Brown et al. (2011).

1. Gillův hematoxylin – 5 min
2. Promytí vodou 3x po dobu 1 min
3. Odbarvení v 120 mM HCl po dobu 20 s
4. Diferenciace hematoxylinu v roztoku 2g NaHCO₃ a 20g MgSO₄·7H₂O v 1l po dobu 60 s
5. Promytí vodou 1x 1 min
6. Eosin Y (vodný roztok)
7. Promytí vodu 3x, 1 min
8. Etanol 70 % 1 min
9. Etanol 96 % 1 min
10. Etanol 100 % 1 min
11. Xylen 1 min
12. Xylen 1 min
13. Zamontování řezů v DPX médiu a pozorování

Pro přípravu řezů na imunofluorescenci a analýzu apoptózy byl použit následující protokol:

1. Odvodnění (doba dle velikosti tkáně, ale pro každý krok to obvykle není déle než 1-2 hodiny)
 - a) 70% Etanol
 - b) 96% Etanol
 - c) 100% Etanol
 - d) 100% Etanol
 - e) Chloroform
2. Infiltrace v parafínu (Paraplast Plus®) – tkáň je umístěna do jamek (Peel-A-Way® Embedding Mold) o objemu 3 ml a naplněna rozehřátým parafínem a umístěna přes noc do pícky temperované na 62 °C.
3. Orientace tkáně – jamka s parafínem se vyndá z pícky a tkáň se pomocí nahřátých pinzet nad kahanem naorientuje dle potřeby, následně se vzorek nechá přes noc polymerizovat na pokojové teplotě.
4. Připevnění bločků na držák (záleží na mikrotomu)
5. Otrimování bločku
6. Krájení (obvykle nelze krájet tenčí než 5-7 mikrometrů)
7. Natažení řezů na superforst sklíčka
8. Sušení na plotýnce – 45 °C, 24hodin.
9. Uložení sklíček do 4 °C

Apoptóza

Pro detekci apoptotických buněk in-situ byl použit komerčně dostupný kit Invitrogen™ Click-iT™ Plus TUNEL Assay Kits for In Situ Apoptosis Detection. Parafínové řezy byly zpracovány dle instrukcí výrobce, včetně pozitivních kontrol ošetřených DNázou (Click-iT™ Plus TUNEL Assay for in situ apoptosis detection with Alexa Fluor™ dyes, 2017).

Imunofluorescence

Pro značení protilátkami byly testovány následující primární konjugované protilátky

- Alexa Fluor 488 Anti-beta Actin antibody (SP124) ab267526, host králík, beta actin je běžný protein nacházející se v cytoskeletonu buněk
- Alexa Fluor 488 Anti-PCNA antibody (PC10) ab201672, host králík–Proliferating Cell Nuclear Antigen je znakem probíhající DNA replikace během S fáze

Pro účely stanovení změny aktivity zárodečných buněk v průběhu stárnutí bylo jako marker použito barvení monoklonální protilátkou značící proliferující buněčný nukleární antigen (PCNA). Tento protein je syntetizován v G1 a S fázi buněčného cyklu a má funkci pro postup buněčného cyklu, replikaci DNA a opravu DNA. Umožňuje tedy identifikovat aktivní spermatocyty, které se v daném čase podílí na spermatogenezi. Pro analýzu byla vybrána stádia 2, 5 a 7 měsíců po oplození. (Horton et al., 2013)

Beta actin patří do rodiny actinů, což jsou vysoce konzervované proteiny lokalizované především v cytoplazmě a cytoskeletonu. Protilátky na beta actin jsou charakteristické svojí vysokou homologií s dalšími actiny (gamma actin, cytoplazmatický actin a actinem srdečního, hladkého a kosterního svalstva) (PA5-30749, 2022)

Vzorky byly zpracovány podle modifikovaného protokolu výrobce protilátek.

Z usmrcených jedinců byly vyjmuty testes a fixovány po dobu 24 h v 4 % paraformaldehydu v PBS. Následně byly testes promyty v 70 % etanolu a uchovány ve 4 °C až do zpracování. Pro histologické zpracování byly testes odvodněny v 96 % a 100 % etanolu a chloroformu, vždy po 2x po 30 minutách. Odvodněné testes byly přemístěny do jamek s tekutým parafinem a infiltrovány po dobu 20 h v 62 °C. Po infiltraci byly testes vyjmuty z vyhřívaného inkubátoru a naorientovány pro transverzální řezy a polymerizovány po dobu 24 h v pokojové teplotě. Řezy o tloušťce 7µm byly připraveny na mikrotomu, krájeny na vodu, nataženy na Superfrost podložní sklička vysušeny na plotýnce po dobu 20 h při teplotě 45 °C.

Pro barvení protilátkami byly řezy prvně deparafinizovány v xylenu (2x 5 min), zavodněny v sestupné etanolové řadě (100 %, 96 % a 70 %, vždy 1x 5 min) a následně 3x promyty v destilované vodě. Z důvodů fixace nebylo možné aplikovat barvení protilátkou bez obnovení epitopů. Pro teplotní obnovení epitopů byl použit roztok citrátů sodného (10 mM citrát sodný 0.05% Tween 20, pH 6.0). Deparafinizované a zavodněné řezy byly umístěny do horizontálních držáků na podložní sklička v roztoku ohřátém na

95-97 °C, ve kterém byly drženy po dobu 20 min. Následně byl roztok pozvolně ochlazen ve vodní lázni na pokojovou teplotu.

Dalším krokem byla permabilizace buněk, pro kterou byl použit protokol doporučovaný výrobcem protilátky, kdy řezy byly inkubovány po dobu 10 min v PBS s 0,3 % Tween a 0,1 % Triton X. Následně byly řezy promyty v PBS s 0,1 % Tween.

Pro vyblokování nespecifického barvení bylo použito 10 % koží sérum v PBS s 0,1 % Tween, které bylo na řezy aplikováno po dobu 30 min. Následně byly řezy promyty v PBS.

Primární protilátka naředěná v PBS s 0,1 % Tween a 4 % kozím sérem, byla v množství 150 µl aplikována na sklíčko s řezy, přikryto plastovým krycím sklíčkem a ponecháno v 4 °C a temnotě. Po inkubaci v primární protilátce byla sklíčka promyta v PBS a aplikována sekundární protilátka. Podrobné údaje k ředění jednotlivých protilátek a délce inkubace jsou uvedeny v tabulce č. 1. Po dokončení inkubace byly sklíčka promyta v destilované vodě. Jádra buněk byla obarvena Hoechstovo barvivem v koncentraci 1 µg na 1 ml po dobu 10 min. Následně byla sklíčka promyta v destilované vodě, odvodněna v vzestupné etanolové řadě (70 %, 96 %, 100 %) a xylenu vždy 1 min a následně zamontována do DPX média a držena ve tmě až do fotodokumentace.

Tabulka 1: Použité primární a sekundární protilátky, včetně jejich ředění a inkubace.

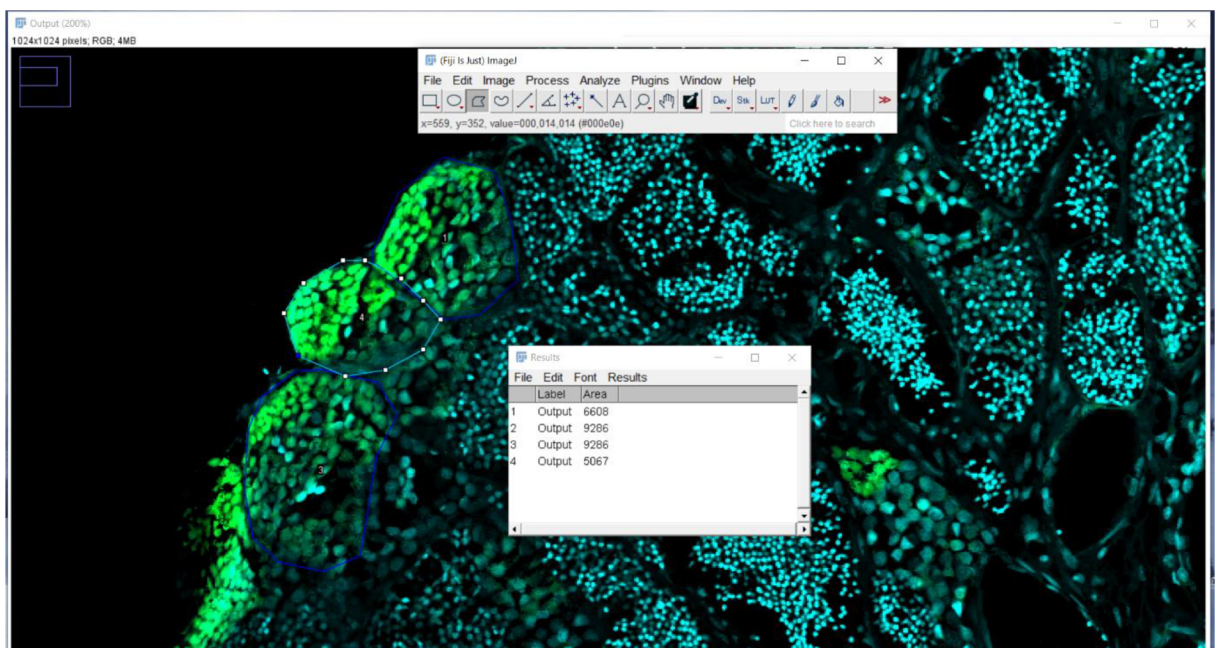
Primární protilátka a host	Ředění a délka inkubace primární konjugované protilátky
PCNA – králík, Alexa Fluor® 488 Anti-PCNA antibody [PC10] (ab201672)	1:200, 24 h
b-actin – králík, Recombinant Alexa Fluor® 488 Anti-beta Actin antibody [SP124] (ab267526)	1:200, 24 h

Zdroj: vlastní

Preparáty byly foceny na konfokálním mikroskopu Olympus FV 3000. Základní nastavení zahrnovalo použití vysoko rozlišujícího Galvano jednosměrného skenu, s velikostí skenované plochy 1024 x 1024 pixelů, s dobou osvitů 8 µs/pixel. Pro zobrazení byly použity lasery excitující na vlnové délce 405nm (Hoechstovo barvivo) a 488nm

(sekundární protilátka Alexa fluor 488) s odpovídajícími spektrálními filtry. Oba kanály byly snímány vysoko senzitivním HSD spektrálním detektorem.

Pro kvantifikaci buněčné proliferace pomocí PCNA protilátky byly analyzovány vždy tři řezy z každého jedince a stádia. Celá plocha testes byla pro kvantitativní analýzu focena 20x imerzním objektivem, vždy 5 vrstev, každá po 1 μ m. Získané vrstvy včetně sloučeného modrého a zeleného kanálu s měřítkem byly exportovány v programu FluoView. Následně byly vrstvy nahrány do software FIJI, z jednotlivých obrázků byla vytvořena série („Images to stack“) a pomocí pluginu zvětšená hloubka ostrosti („Extended depth of field“) byly jednotlivé vrstvy sloučeny do jednoho obrázku. Sloučený obrázek byl analyzován pomocí funkce polygonu, kdy byla měřena plocha spermatocyst pozitivních na PCNA (Obr. 6) a vztažena na celkovou plochu testes na řezu v procentech.



Obrázek 6: Analýza obrazu z konfokálního mikroskopu pomocí software FIJI.

Zdroj: vlastní

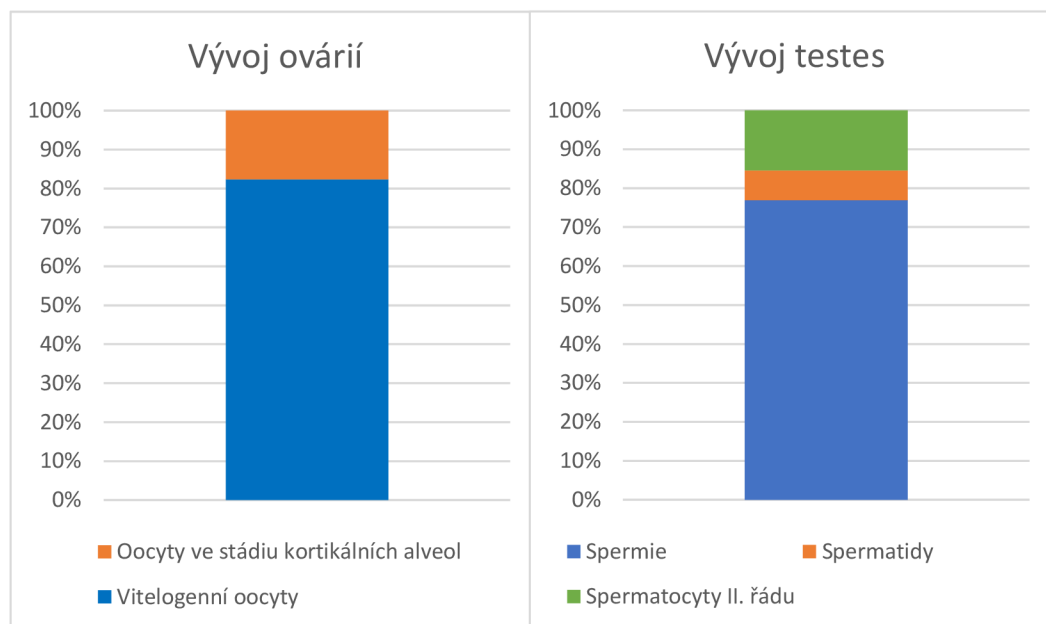
Pro další morfometrické analýzy bylo postupováno obdobně. Plocha zárodečného epitelu oproti ploše prázdných spermatocyst a pojivové tkáně byla analyzována ze složeného snímku celého řezu testes. Pomocí FIJI softwaru a nástroje polygon byla změřena celá plocha testes a následně plocha prázdných spermatocyst a pojivové tkáně. Apoptóza byla kvantifikována taktéž v softwaru FIJI, kdy byla vytvořena náhodná mřížka pomocí funkce „GRID“ a byl spočítán počet a typ (spermatogonie, spermatocyty, spermie)

apoptotických buněk v náhodě vybraných 10 čtvercích. Následně byla pomocí polygonu spočítána celková plocha testes. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako celkový počet buněk na ploše testes daného jedince a zároveň přepočtena na relativní počet apoptotických buněk na 1 mm² plochy testes.

7 Výsledky

7.1 Vývoj gonád

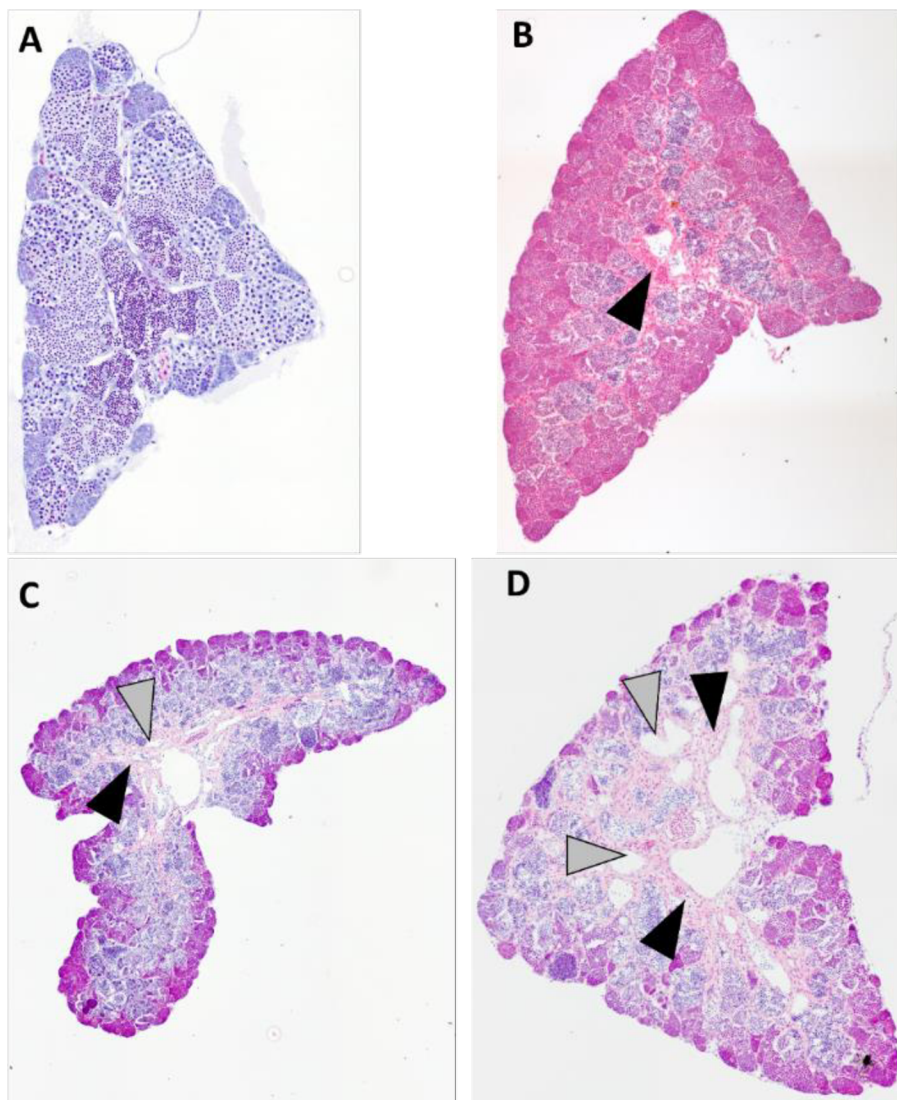
Pro výzkum vývoje gonád bylo zpracováno celkem 233 ryb do 0 do 36 dne po vykolení z toho bylo 118 samců a 115 samic. V období 22. dne po vylíhnutí bylo zpracováno 30 ryb, z toho 13 samců a 17 samic. Ze 17 samic měly 3 samice ovária obsahující oocyty ve stádiu kortikálních alveol a 14 oocyty ve stádiu vitelogeneze. Ze 13 samců měli 2 samci v testes spermatocyty II. řádu, 1 samec spermatidy a 10 samců spermie. Stádia byla vyhodnocena na základně přítomnosti nejpokročilejšího typu zárodečných buněk.



Obrázek 7: Fáze vývoje ovárií a testes

Grafy na obrázku 7 popisují % zastoupení nejpokročilejšího stádia vývoje gonád u samic a u samců v období 22 dnů po vylíhnutí

Zdroj: vlastní



Obrázek 8: morfologické změny testes v průběhu života halančíka tyrkysového

Zdroj: vlastní

Obrázek 8 značí morfologické změny testes v průběhu života halančíka tyrkysového. A) Samec ve stáří jednoho měsíce, v testes se nachází minimální množství pojivové tkáně. B) Samec ve stáří dvou měsíců, lze pozorovat přítomnost pojivové tkáně (černá šipka). C) Samec ve stáří 4 měsíců, kde je již velmi znatelný úbytek zárodečného epitelu, zvýšená přítomnost pojivové tkáně (černá šipka) a přítomnost prázdných spermatocyst (šedá šipka). D) Samec ve věku 6 měsíců, velkým množstvím pojivové tkáně (černá šipka) a několika prázdnými spermatocystami (šedá šipka).

Tabulka 2: Porovnání plochy zárodečného epitelu a pojivové tkáně testes

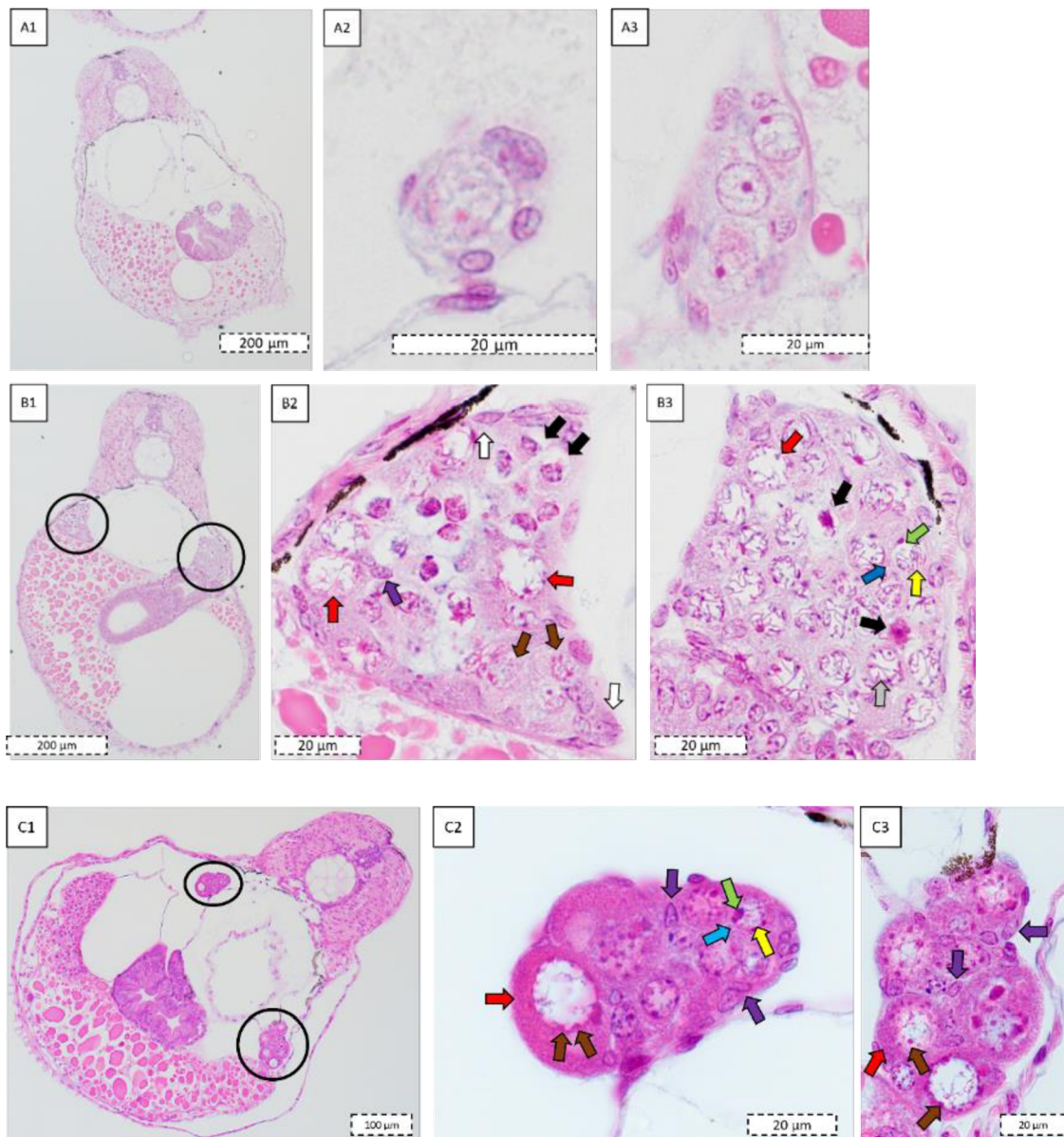
Data ukazují průměrné hodnoty plochy zárodečného epitelu a pojivové tkáně, včetně směrodatných odchylek v závislosti na věku v měsících.

Věk v měsících	% zárodečného epitelu	% pojivové tkáně a prázdných spermatocyst
1	96,78 ± 0,06	3,22 ± 0,06
2	94,13 ± 2,02	5,87 ± 2,02
4	78,66 ± 9,05	21,34 ± 9,05
6	83,58 ± 7,56	16,42 ± 7,56

Zdroj: vlastní

Pro porovnání plochy zárodečného epitelu a pojivové tkáně s prázdnými spermatocystami byli zpracovány vždy 3 ryby v každém období, a to v jednom, dvou, čtyřech a šesti měsících. V jednom měsíci byl průměr zárodečného epitelu 96,78 % ± 0,06 ku 3,22 % ± 0,06 pojivové tkáně. Ve dvou měsících nenastaly velké změny, průměr zárodečného epitelu byl 94,13 % ± 2,02 ku 5,87 % ± 2,02. Během čtvrtého měsíce začala plocha zárodečného epitelu klesat, a to na průměrnou hodnotu 78,66 % ± 9,05 a průměr pojivové tkáně se zvedl na 21,34 % ± 9,05. V šestém měsíci došlo opět ke slabšímu vzrůstu průměrné hodnoty zárodečného epitelu na 83,58 % ± 7,56 na 16,42 % ± 7,56 pojivové tkáně. (viz. tabulka 2)

7.1.1 Vývoj samičích gonád



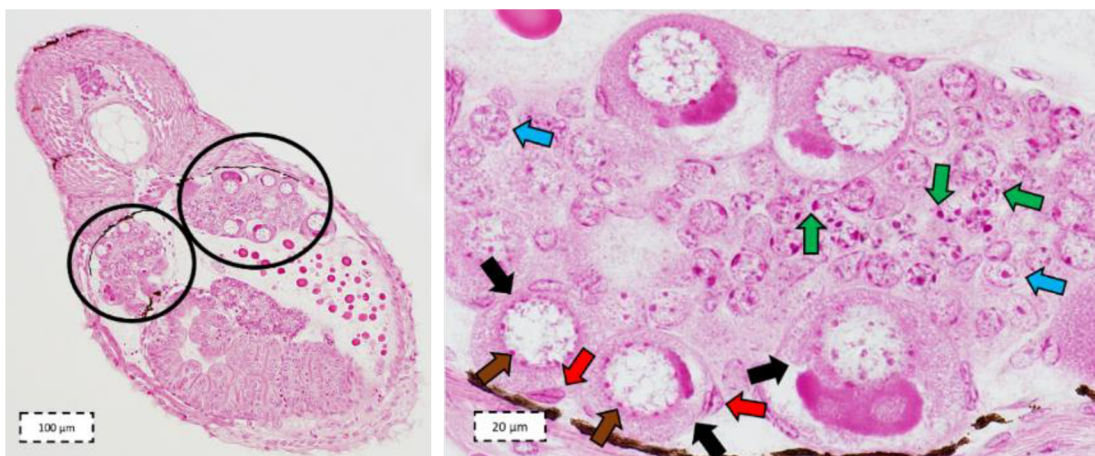
Obrázek 9: 0 DPH

Zdroj: vlastní

Ryby A, B a C byly zpracovány v den vylíhnutí tedy 0 DPH (Days post hatch – dny po vykulení). Obrázek A1, B1 a C1 jsou snímky transverzálních řezů celých ryb, kdy jsou u obrázku B1 a C1 označené gonády černím kruhem.

Ryba A nese žádné znaky diference pohlavních buněk, gonády jsou složeny pouze ze zárodečných kmenových buněk. Nenachází se zde žádné znaky, které by ukazovaly na diferenciaci samčí nebo samičí gonády, při čemž buňky mají zřetelné jádro s definovaným jadérkem. Zatímco ryba B je již diferenciována v samici, kdy většina

zárodečných buněk se nachází v profázi meiózy I. ihned po vylíhnutí. Na obrázku B2 můžeme vidět proliferující oogonie (černé šipky), které mají kondenzované chromozómy a oocyty v leptotene (hnědé šipky), tedy oocyty v časně fázi profáze. Na obrázku B3 vidíme primární oocyt ve stádiu zygotene (modrá šipka), u které jsou chromozómy (žlutá šipka) lokalizovány na jednom pólu buňky, tento pól je naproti jadérku (zelená šipka), dále vidíme primární oocyty ve stádiu pachytene, které obsahují větší počet jadérek v jádře (šedá šipka). Na snímcích obou gonád jsou buňky s pozdním pachytene a časným diplotene (červená šipka), na těchto buňkách je také vidět redukce dispergováných chromozomů a jadérka lokalizovaná na okraji jádra. V neposlední řadě zde vidíme stromální buňky s časnými folikulárními buňkami (fialová šipka), které obklopují primární oocyty (bílé šipky). Na obrázcích ryby C jsou vidět diplotenní oocyty s více definovanými jadérky na periférii jádra (červená šipka), proliferující folikulární buňky, se svým typicky protáhlým tvarem, při čemž primární oocyty jsou vždy v kontaktu s folikulárními buňkami (hnědá šipka). A stejně jako na obrázku B3 je zde vidět primární oocyt ve stádiu zygotene (modrá šipka), kde jsou chromozómy (žlutá šipka) synchronizovány na jednom pólu buňky, tento pól je naproti jadérku (zelená šipka).

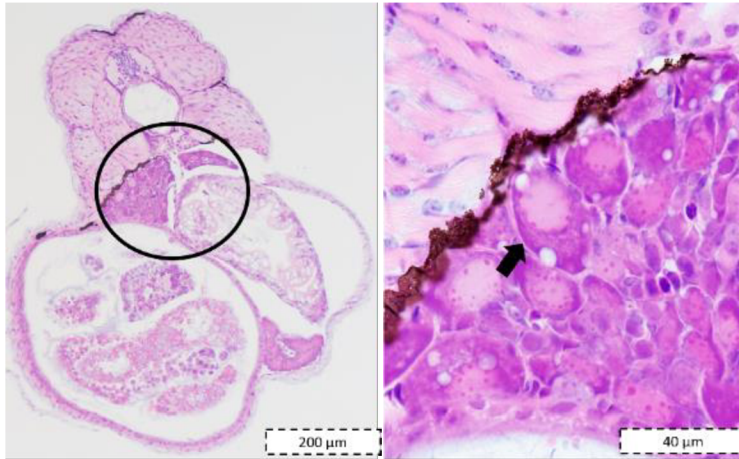


Obrázek 10: 2 DPH

Zdroj: vlastní

Obrázek 11 vznikl ze vzorku ryby, která byla zpracována 2 dny po vylíhnutí (2 DPH), při čemž obrázek vlevo je snímek transversálního řezu celé ryby, kdy jsou černě označena ovária, kdy je jedna z nich vidět na obrázku vpravo. Na ováriích jsou vidět primární oocyty ve 2. stádiu (černá šipka), jejich velikost je přibližně 20-50 µm. V okrajích jádra těchto buněk je vidět několik perinukleárních jader (hnědá šipka). Folikulární buňky (červené šipky) začínají utvářet dvě vrstvy obalující primární oocyt, kdy tedy dochází

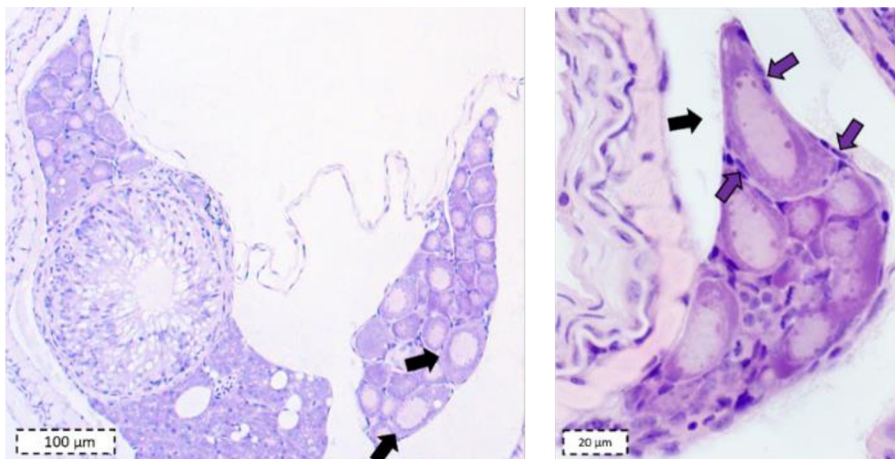
k tvorbě granulózních buněk a buněk théky. Dále je zde vidět větší množství oogonií, v klastrech které se neproliferují (modrá šipka), ale i těch, které se množí a mají více kondenzovaných chromatin a menší velikost (zelená šipka).



Obrázek 11: 4 DPH

Zdroj: vlastní

Obrázek 11 je snímek ryby zpracované 4 dny po vylíhnutí (4 DPH), kdy nalevo je snímek transversálního řezu celé ryby, kde jsou černým kruhem označena ovaria. Histologicky se ryba příliš neliší od ryby ve dvou dnech po vylíhnutí, taky se zde nachází velké množství primárních oocytů (černé šipky), zvětšují svoji velikost, nicméně se stále jedná o fázi primárního růstu bez vitelogeneze.

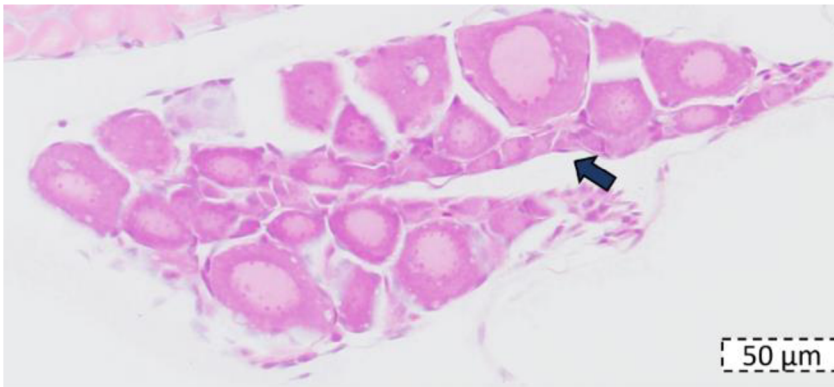


Obrázek 12: 6 DPH

Zdroj: vlastní

Obrázek 12 vznikl snímkem z ryby, která byla zpracována 6 dní po vylíhnutí (6 DPH). Jsou zde primární oocyty již o velikosti od 50 do 100 µm (černá šipka), které jsou stále

v perinukleárním stadiu, ale už mají velikost okolo 50-70 μm . Jsou zde i proliferující folikulární buňky (fialová šipka), které obklopují všechny oocyty.



Obrázek 13: 8 DPH

Zdroj: vlastní

Obrázek 13 je snímek ryby zpracované 8 dní po vylíhnutí. Už na první pohled je zřejmé, že vaječníky jsou velmi podobné s těmi v 6 dnech, jeden z mála rozdílů je ten, že v 8 dnech se objevuje ovariální dutina (modrá šipka), což je sekundární pohlavní znak pro diferenciaci samičího pohlaví. Nicméně v případě halančika tyrkysového dochází k vývoji ovariální dutiny již v pokročilé fázi primárního růstu oocytů.



Obrázek 14: 10 DPH

Zdroj: vlastní

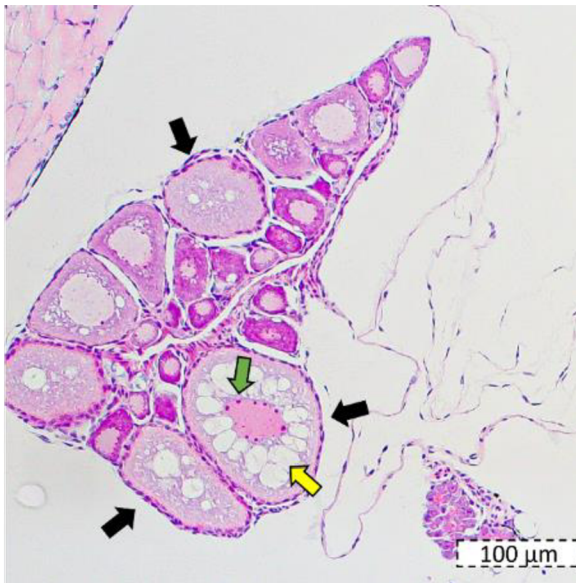
Obrázek 14 je snímek ryby zpracované 10 dní po vylíhnutí. V tomto období se objevují znaky nástupu puberty a začínají se v cytoplasmě oocyty tvořit kortikální alveoly (žlutá šipka), které jsou úplně obklopují folikulární buňky (červená šipka). V těchto oocytech (černá šipka) jsou alveoly v různých stádiích. Lze jasně odlišit bazální laminu oocyty (zelená šipka).



Obrázek 15: 12 DPH

Zdroj: vlastní

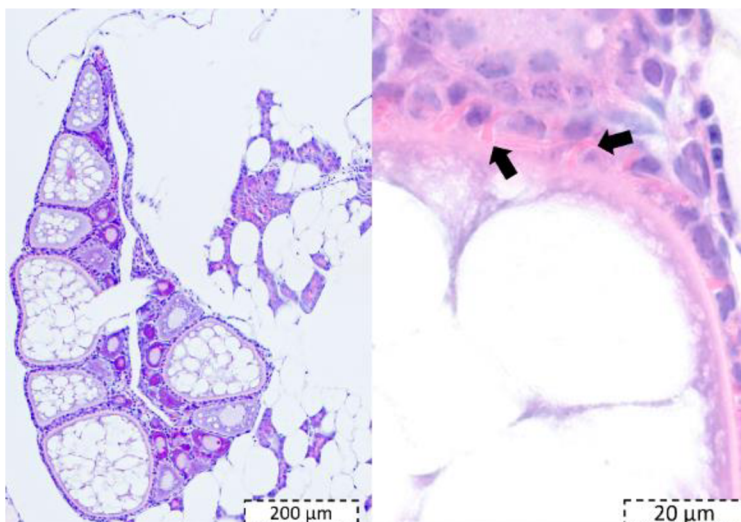
Ve stádiu 12 DPH dochází k pokročilému vývoji těch největších oocytů ovária, které mají více než 100 μm v průměru. Můžeme pozorovat, že průměr jednotlivých kortikálních alveol se zvětšuje oproti předchozímu stádiu (obr. 14). Nicméně je patrné, že pouze několik jednotlivých oocytů pokračuje v růstu, většina oocytů nepřesahuje velikost 100 μm .



Obrázek 16: 14 DPH

Zdroj: vlastní

Na obrázku 16 je vaječník samice zpracována 14 dní po vylíhnutí (14 DPH). Je zde opět vidět velké množství oocytů (černá šipka), které obsahují alveoly, tyto oocyty značí pokročilý postup oogeneze, například ztmavnutí jádra (zelná šipka).



Obrázek 17: 16 DPH

Zdroj: vlastní

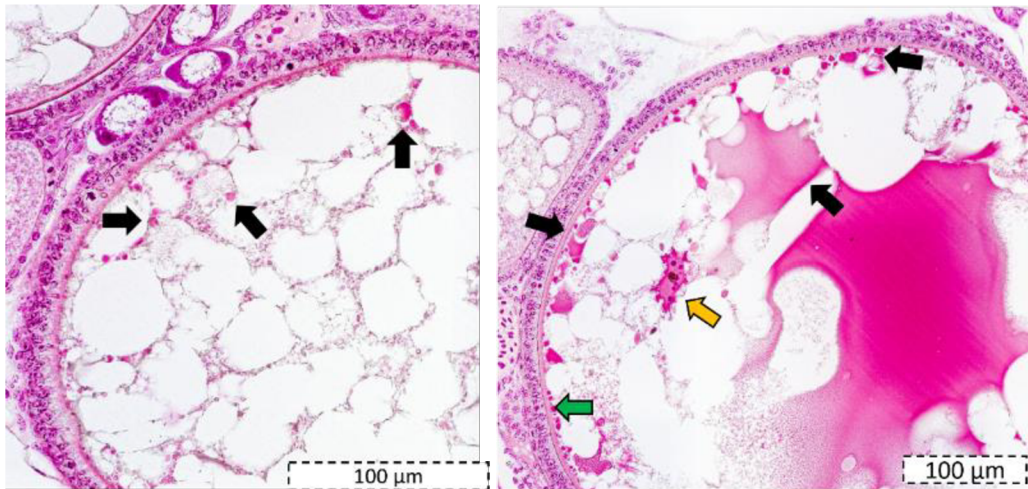
Obrázek 17 vznikl z ryby zpracované 16 dní po vylíhnutí (16 DPH). Je zde velké množství kortikální alveol v ooplazmě, které už splývají do větších celků, také se zde začínají vyskytovat první chloupky (černá šipka).



Obrázek 18: 18 DPH

Zdroj: vlastní

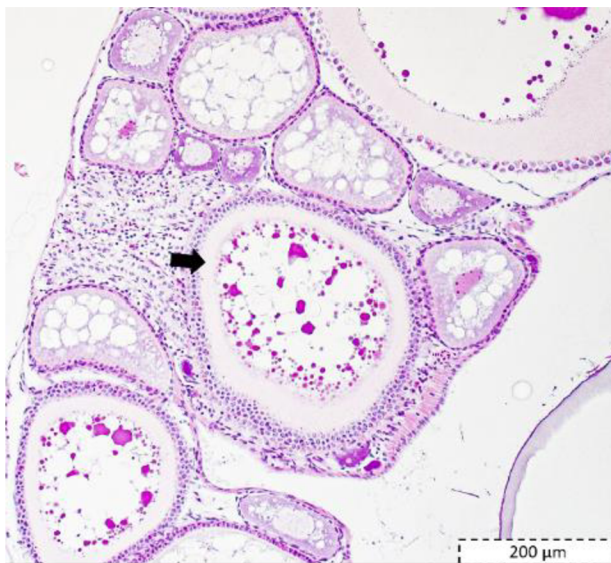
Na obrázku 18 vidíme gonády samice zpracované 18 dní po vylíhnutí, kde je postup jednotlivých kortikálních alveolů, splývajících ve větší alveoly, avšak zde stále není detekována vitelogeneze.



Obrázek 19: 22 DPH

Zdroj: vlastní

Na obrázku 19 vidíme vzorky z ryby 22 dní po vylíhnutí. Je zde velmi dobře definovaná *zona pelucida* (zelená šipka) a je zde také možné již detekovat vitelogenezi (černá šipka). Zároveň dochází k migraci jádra oocyty směrem k jeho periferii (žlutá šipka).

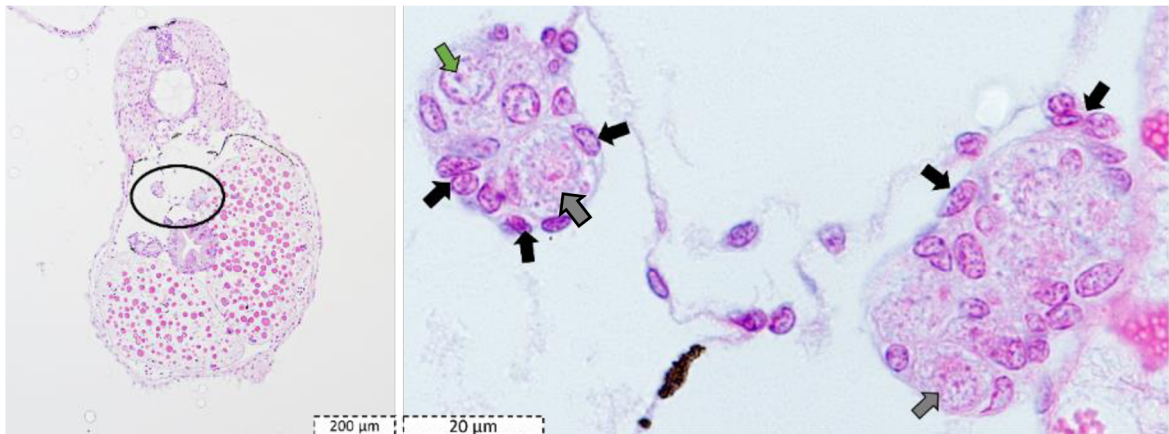


Obrázek 20: 29 DPH

Zdroj: vlastní

Obrázek 20 vznik ze vzorku 29 dní po vylíhnutí, je zřejmé, že hranice pro začátek vitelogenního růstu je spojena s nárůstem velikosti oocytů přes 200 μm.

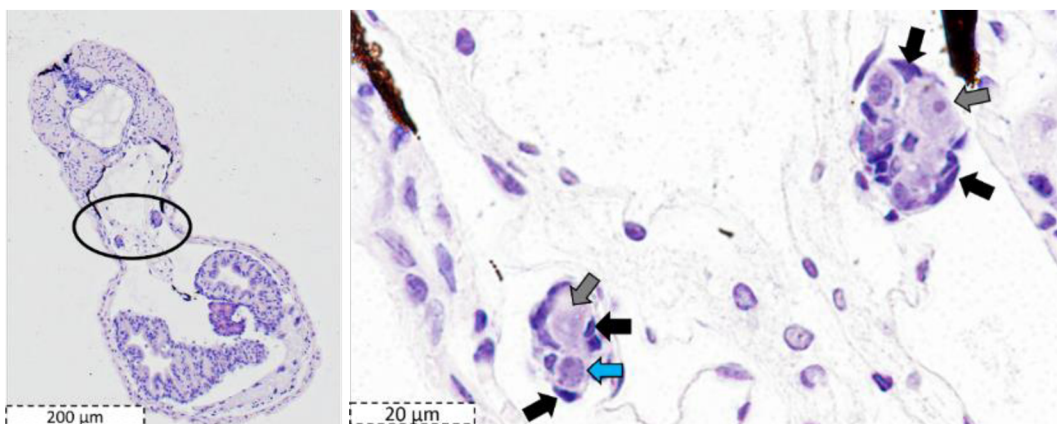
7.1.2 Vývoj samčích gonád



Obrázek 21: 0DPH

Zdroj: vlastní

Na obrázku 21 je samec v den vylíhnutí (0 DPH), vlevo je transverzální řez celým tělem, kde jsou černým kruhem označené gonády, zatímco napravo jsou gonády. Tento samec zatím není zcela diferenciován, tedy není zde stoprocentně definované pohlaví. Oválné buňky s tmavou cytoplazmou a malými jádry jsou buňky somatické (černé šipky), tyto buňky obklopují buňky zárodečné. V gonádě lze identifikovat raná stádia zárodečných kmenových buněk charakteristické násobně větší velikosti (šedá šipka), než již samčí diferenciované spermatogonie (zelená šipka)

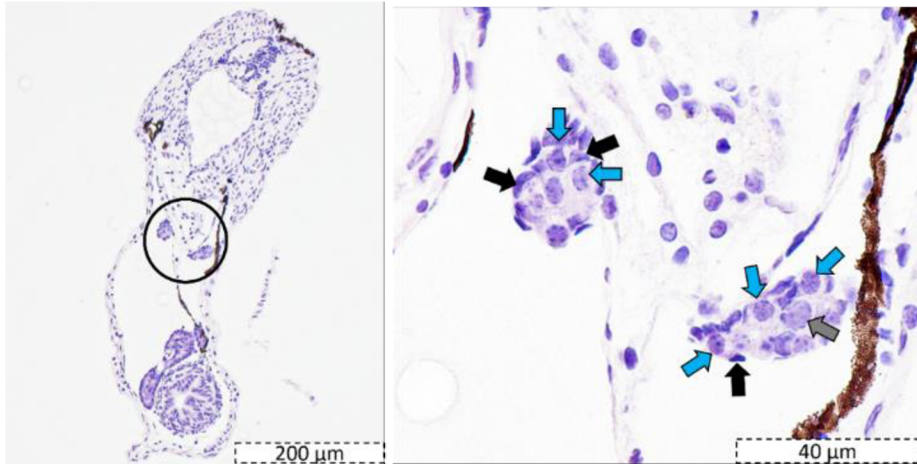


Obrázek 22: 2 DPH

Zdroj: vlastní

Obrázek 22 je snímek rybiho samce vytvořený 2 dny po vylíhnutí (2 DPH), vlevo je transverzální řez celé ryb, kde jsou černě označeným oválem gonády, zatímco vpravo jsou gonády. Vidíme zde somatické buňky, které jsou nápadně podobné Sertolihovo buňkám, které jsme našli ve zralých gonádách, viz. obr. 28 (černé šipky), dále

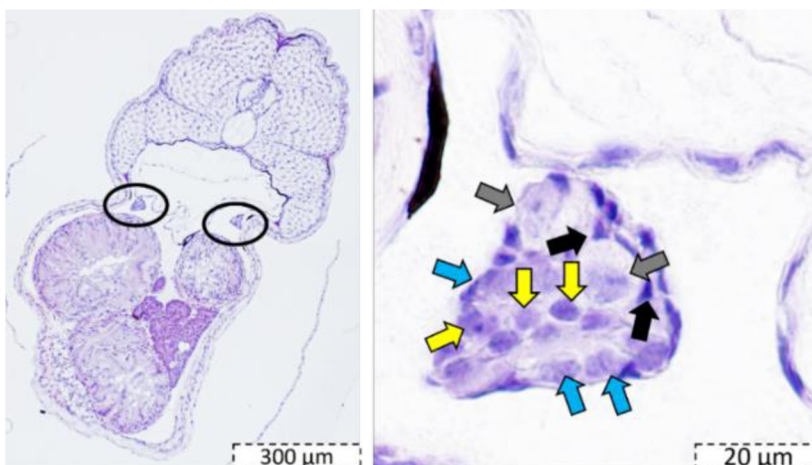
spermatogonie typu A, které jsou typické světlou cytoplazmou, definovanými jádry a větší velikostí (šedá šipka) a nakonec jsou zde spermatogonie typu B, které mají tmavou cytoplazmu, menší jádra a jsou zhruba o polovinu menší než spermatogonie typu A (modrá šipka).



Obrázek 23: 4 DPH

Zdroj: vlastní

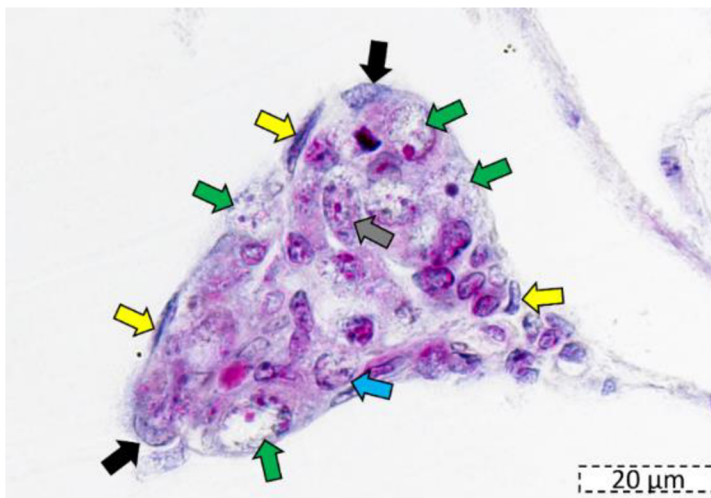
Na obrázku 23 vidíme rybiho samce zpracovaného 4 dny po vylíhnutí (4 DPH), při čemž nalevo je celá ryba v průřezu, kde jsou gonády černě označeny a napravo jsou zvětšené gonády. V zásadě je diferenciace velmi podobná jako u ryby 2 dny po vylíhnutí opět se tu nachází somatické pohlavní buňky (černá šipka), spermatogonie typu A (šedá šipka) i spermatogonie typu B (modrá šipka). Jeden z mála rozdílů mezi rybou 2 nebo 4 dny po vylíhnutí, je zvýšený počet spermatogonií typu B u ryb 4 dny po vylíhnutí, což svědčí o mitotické proliferaci zárodečných buněk.



Obrázek 24: 6 DPH

Zdroj: vlastní

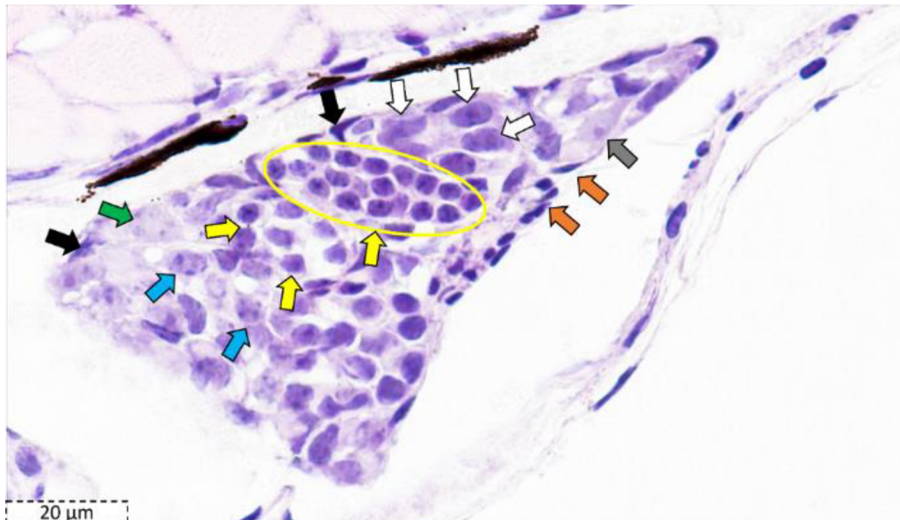
Obrázek 24 je snímek ryby zpracované 6 dní po vylíhnutí (6 DPH), vlevo je snímek je transverzálního řezu celou rybou, kde jsou černě označené gonády, vlevo jsou 15krát zvětšené gonády. Můžeme zde vidět Sertoliho buňky (černé šipky) a v jejich těsné blízkosti se nachází velké buňky: spermatogonie typu A (šedé šipky) se světlou cytoplazmou. Spermatogonie typu B se organizují do spermatocyst (modrá šipka). Zajímavá je přítomnost primárních spermatocytů (8 buněk označených žlutou šipkou), jelikož se zdá, že některé spermatogonie typu A směřují k diferenciaci v pohlavní buňky místo samoobnovacího dělení, aby zajistily dostatečnou zásobu kmenových buněk.



Obrázek 25: 8 DPH

Zdroj: vlastní

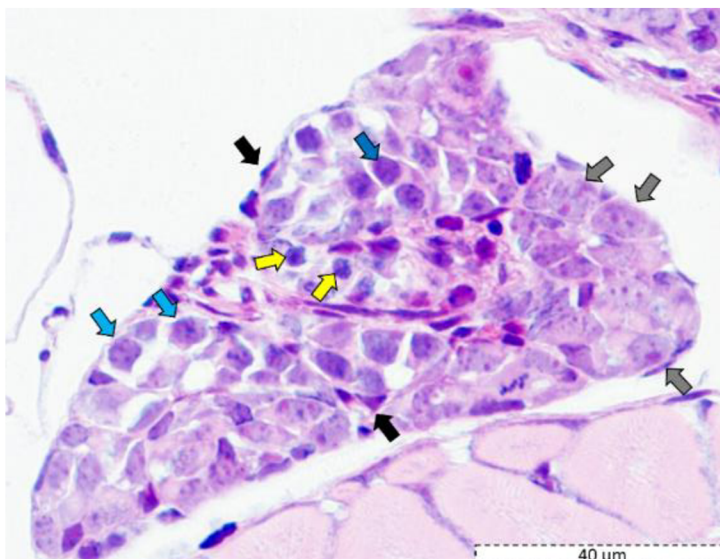
Na obrázku 25 je vzorek ryby zpracované 8 dní po vylíhnutí. Na okrajích testes vidíme Sertoliho buňky (černé šipky), v jejich se pak obvykle nachází spermatogonie typu A (šedá šipka), které mají světlou cytoplazmu a jsou to poměrně velké buňky. Spermatogonie typu B (modrá šipka) jsou organizované do spermatocyst. Po celém obvodu vidíme dva typy buněk, buňky (zelená šipka), které vidíme už ve chvíli vylíhnutí, což svědčí o mitotické proliferaci zárodečných buněk. a různé typy buněk gonád (žlutá šipka).



Obrázek 26: 10 DPH

Zdroj: vlastní

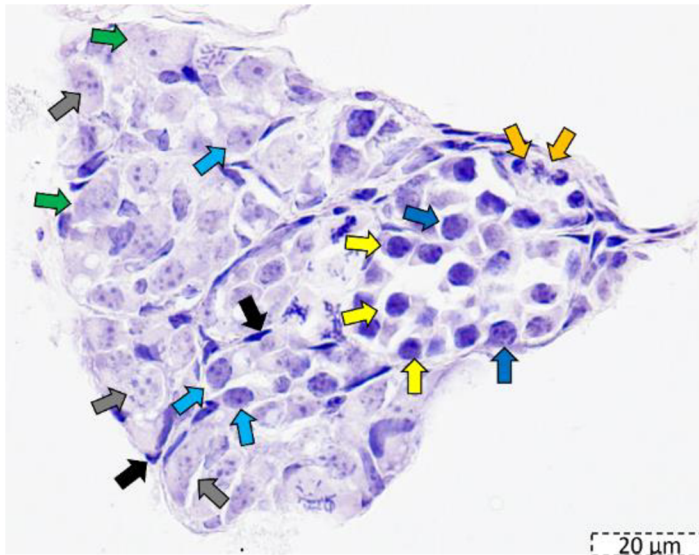
Na obrázku 26 je vidět varle samce 10 dní po vylíhnutí (10 DPH). Na obvodu jsou vidět Sertoliho buňky (černá šipka) a kmenové spermatogonie typu A (zelená šipka). Pravém hrotu je vidět časná spermatogonie typu A (šedá šipka) s typickými znaky nalevo od ní jsou vidět spermatogonie typu A v pozdějším stádiu (bílá šipka), které již tvoří spermatocystu. Nacházejí se zde i spermatogonie typu B v ranném stádiu (modrá šipka), primární spermatocyty (oranžová šipka), které se organizují do spermatocyst a různé typy buněk gonád (žlutá šipka).



Obrázek 27: 12 DPH

Zdroj: vlastní

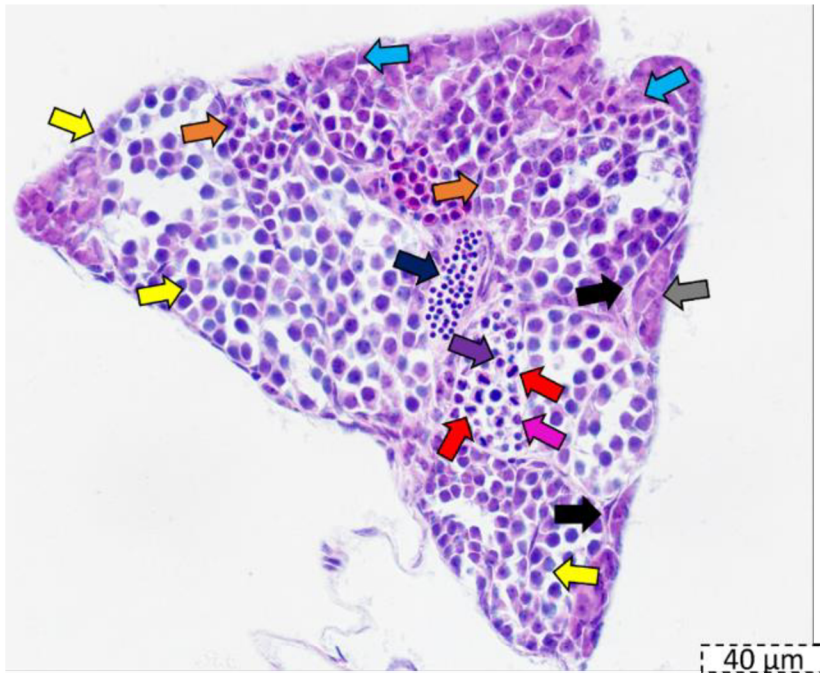
Na obrázku 27 je testes ryby zpracované 12 dní po vylíhnutí (12 DPH). Sertoliho buňky (černá šipka) jsou jedny z menších buněk, které můžeme v testes najít. Stále největší buňky jsou spermatogonie typu A (šedá šipka), dále pak ranné spermatogonie typu B (světle modrá šipka) a velikostně podobné ale s tmavým jádrem spermatogonie typu B v pozdním stádiu (tmavě modrá šipka). Samozřejmě se zde nachází i primární spermatocyty (žlutá šipka).



Obrázek 28: 14 DPH

Zdroj: vlastní

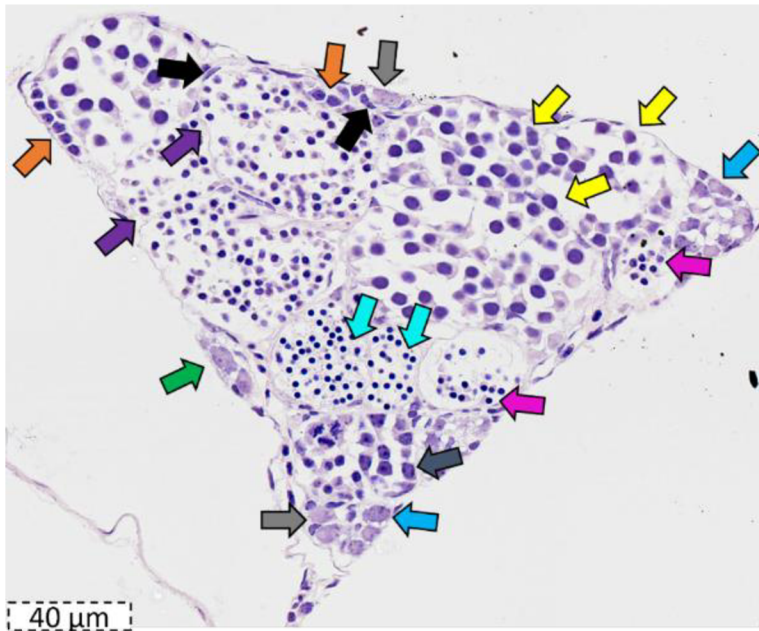
Obrázek 28 je snímek testes samce 14 dní po vylíhnutí (14 DPH). Jsou zde stejné buňky jako u jedince ve stádiu 12 DPH jako: Sertoliho buňky (černá šipka), spermatogonie typu A (šedá šipka), spermatogonie typu B v ranném stádiu (světle modrá šipka) i v pozdním stádiu (tmavě modrá šipka), kmenová buňka spermatogonie (zelená šipka) a primární spermatocyty (oranžová šipka). Ovšem zde můžeme vidět i sekundární spermatocyty (žlutá šipka).



Obrázek 29: 16 DPH

Zdroj: vlastní

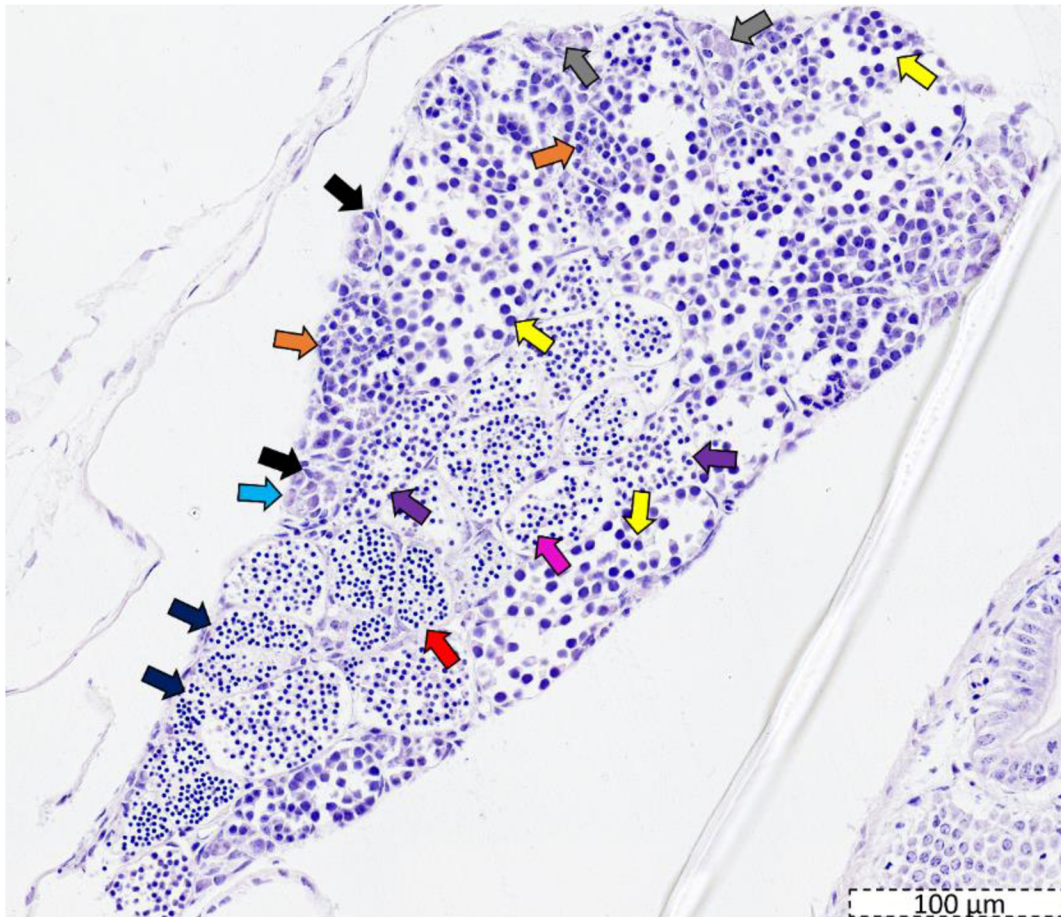
Obrázek 29 ukazuje vzorek testes ze samce, zpracovaný 16 dní po vylíhnutí (16 DPH). Zůstávají zachované buňky jako Sertoliho buňky (černá šipka), spermatogonie typu A (šedá šipka), spermatogonie typu B v ranném stádiu (světle modrá šipka), kmenová B spermatogonie (zelená šipka) a primární spermatocyty (oranžová šipka) i sekundární spermatocyty (žlutá šipka). Ve chvíli, kdy se sekundární spermatocyty začnou dělit chromozomy se uspořádají do ekvatoriální roviny (červená šipka). Ve stejném místě vidíme časné spermatidy neboli E1 spermatidy (růžová šipka), které jsou typické větším množstvím cytoplazmy, hlavní rozdíl je množství cytoplazmy a mezilehlé spermatidy, neboli E2 spermatidy (fialová šipka). V tomto období můžeme vidět i spermie (tmavě modrá šipka), které mají definovaný krček i bičík.



Obrázek 30: 18 DPH

Zdroj: vlastní

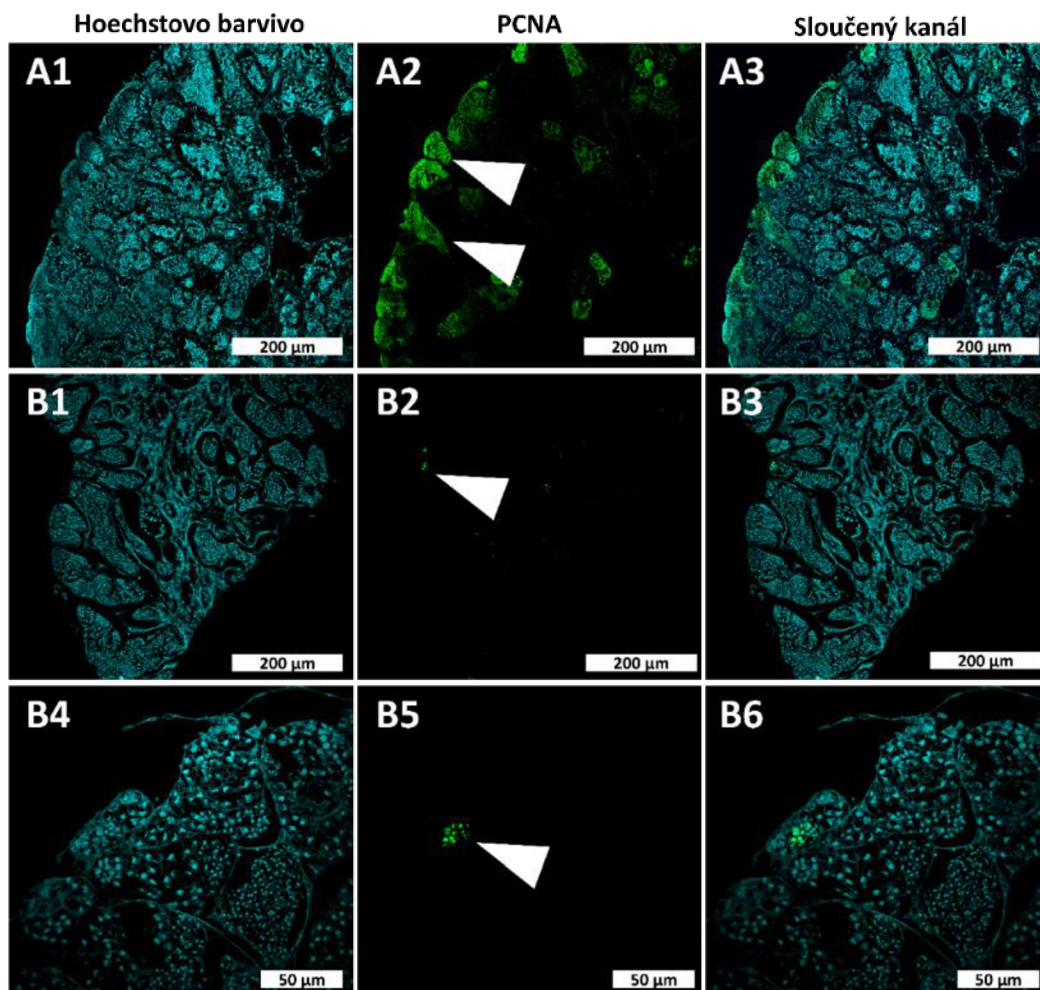
Na obrázku 30 je snímek testes ryby zpracované 18 dní po vylíhnutí (18 DPH). Jsou zde vidět stejné typy buněk jako u ryby 16 dní po vylíhnutí jako: Sertoliho buňky (černá šipka), spermatogonie typu A (šedá šipka), spermatogonie typu B jak ranné (modrá šipka), tak pozdní (tmavě modrá šipka), spermatogonie (zelená šipka), primární spermatocyty (žlutá šipka), sekundární spermatocyty (oranžová šipka), E1 spermatidy (růžová šipka), hlavní rozdíl je množství cytoplazmy, E2 spermatidy (fialová šipka) a spermie (tmavě modro-šedivá šipka), které mají definovaný krček i bičík.



Obrázek 31: 22 DPH

Zdroj: vlastní

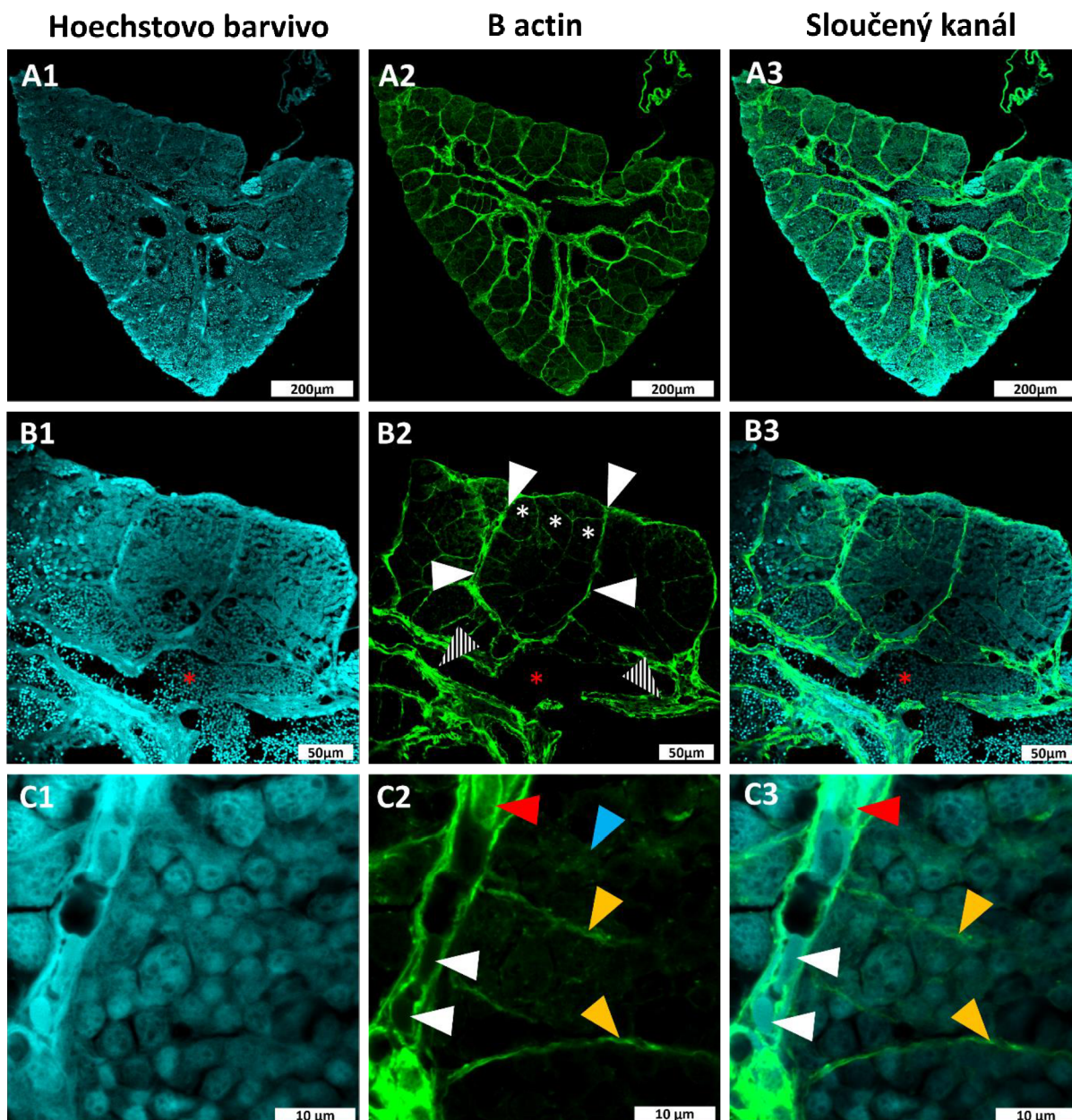
Na obrázku 31 je varle ryby zpracované 22 dní po vylíhnutí (22 DPH). Morfologicky je téměř obdobné jako u jedinců 18 dní po vylíhnutí jako: Sertoliho buňky (černá šipka), spermatogonie typu A (šedá šipka), spermatogonie typu B jak ranné (modrá šipka), tak pozdní (tmavě modrá šipka), spermatogonie (zelená šipka), primární spermatocyty (žlutá šipka), sekundární spermatocyty (oranžová šipka), E1 spermatidy (růžová šipka), hlavní rozdíl je množství cytoplazmy, E2 spermatidy (fialová šipka) a spermie (tmavě modrošedivá šipka), které mají definovaný krček i bičík. Jeden z mála rozdílů je již přítomnost starších spermií (fialová šipka)



Obrázek 32: aktivní proliferace buněk analyzovaná PCNA protilátkou

Zdroj vlastní

Na obrázku 32 vidíme aktivní proliferaci buněk analyzovaná PCNA protilátkou. A) Výřez na část testes samce 2 měsíce po vykulení. A1) Barvení Hoechstovo barvivem vizualizuje jádra buněk. A2) Barvení PCNA protilátkou vizualizuje velký počet aktivních spermatocyst (bílá šipka), které se nacházejí především na periferii testes. A3) Sloučený obrázek z modrého a zeleného kanálu. B) Výřez na část testes samce 7 měsíců po vykulení. B1) Barvení Hoechstovo barvivem vizualizuje jádra buněk. B2) Barvení PCNA protilátkou vizualizuje velmi sporadický výskyt aktivních spermatocyst (bílá šipka). B3) Sloučený obrázek z modrého a zeleného kanálu. B4-B6) Detailní záběr na testes s pouze několika buňkami pozitivních na PCNA protilátku.



Obrázek 33: Vizualizace segmentace testes pomocí beta actin protilátky

Zdroj: vlastní

A) Pohled na transversální řez celým testes. A1) jádra buněk vizualizovaná Hoechstovo barvivem. A2) detekce beta actin proteinu, kdy nejsilnější exprese je lokalizována mimo spermatocysty. A3) Sloučený kanál s detekcí jader buněk a beta actinu. B) Bližší pohled na testes. B1) Barvení Hoechstovo barvivem, červená hvězdička značí lumen testes, ve kterém se shromažďují spermie. B2) Detekce silné exprese beta actin proteinu umožňuje odlišit intersticiální prostor (bílé šipky), který obsahuje spermatocysty (bílé hvězdičky), které vznikly ze společné spermatogonie s jednotlivými. Směrem do středu testes je

patrné zvýšení exprese beta actin proteinu (pruhované šipky) ohraničující lumen testes, ve kterém se shromažďují spermie B3) Sloučený kanál s detekcí jader buněk a beta actinu. C) Detailní pohled ukazující lokalizaci beta actin proteinu v jednotlivých buňkách testes. C1) Barvení Hoechstovo barvivem. C2) V intersticiálním prostoru lze odlišit somatické buňky exprimující přímo v cytoplazmě (červená šipka) a buňky, které tvoří výběžky oddělující jednotlivé spermatocysty (bílé šipky). Dále je patrné oddělení jednotlivých generací spermatocyst, které jsou od sebe odděleny výběžky buněk exprimující beta actin (oranžové šipky). Exprese beta actin přímo v zárodečných buňkách je velmi slabá oproti somatickým buňkám a je detekována u ranějších stádií buněk (modrá šipka, spermatogonie).

PCNA neboli proliferační antigen buněčného jádra se objevuje v závislosti na buněčném cyklu, pokud je aktivní slouží jako kofaktor DNA polymerázy. Je schopný nám detekovat aktivní buňky, v našem případě aktivní spermatocyty. Během prvního měsíce bylo PCNA pozitivní plochy v průměru $15,9 \% \pm 3,33 \%$, ve druhém měsíci tato plocha stoupla na $20,79 \% \pm 4,21 \%$, od čtvrtého měsíce začalo množství aktivních spermatocyst rapidně klesat na $9,71 \% \pm 1,67 \%$. V šestém a sedmém měsíci byl pokles aktivních spermatocyst postupný, v šestém měsíci na $8,94 \% \pm 3,64 \%$ a v sedmém $5,12 \% \pm 3,38 \%$. Během desátého měsíce byla plocha testes pozitivní na PCNA již méně než $0,5 \%$ konkrétně $0,13 \% \pm 0,09 \%$, ovšem desátého měsíce se nám dožila pouze 1 ryba, nebylo tedy možné zahrnout toto období k ostatním, jelikož se ke každému období využily 3 ryby se 3 řezy (viz. obrázek 34). V tabulce 4 vidíme základní zpracování anovou, kde je hodnota p menší než 0,05, konkrétně $1,53 \cdot 10^{-11}$.

Tabulka 3: průměrná PCNA pozitivní plocha u samců

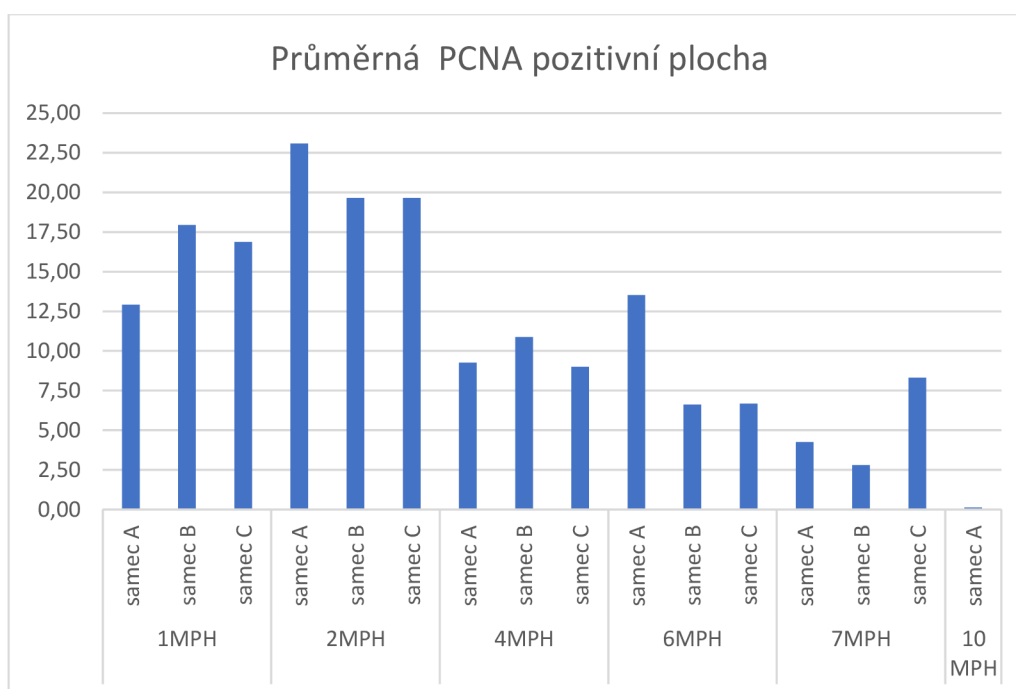
věk v měsících	1	2	4	6	7
PCNA pozitivní plocha testes v %	$15,9 \pm 3,33$	$20,79 \pm 4,21$	$9,71 \pm 1,67$	$8,94 \pm 3,64$	$5,12 \pm 3,38$

Zdroj: vlastní

Tabulka 4: ANOVA

<i>Zdroj variability</i>	<i>SS</i>	<i>Rozdíl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Hodnota P</i>	<i>F krit</i>
Mezi výběry	2007,039	15	133,8026	18,17971	1,53E-11	1,99199
Všechny výběry	235,5199	32	7,359996			
Celkem	2242,559	47				

Zdroj: vlastní

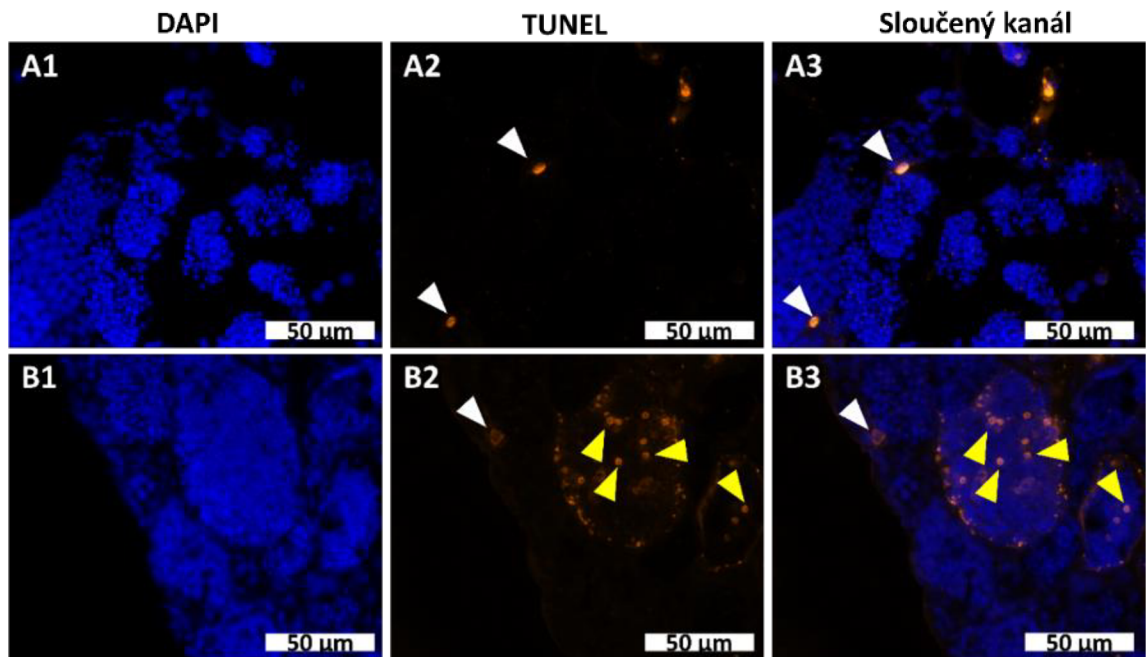


Obrázek 34: PCNA pozitivní plocha

Zdroj: vlastní

Obrázek 34 Znárodnuje výsledky získané analýzou obrazu po barvení řezů testes halančiků ve stáří 1, 2, 4, 6, 7 a 10 měsíců od vykolení pomocí PCNA protilátky, která je markerem aktivní fáze buněčného cyklu

7.2 Apoptóza zárodečných buněk



Obrázek 35: identifikace apoptotických buněk v testes halančíka tyrkysového

Zdroj: vlastní

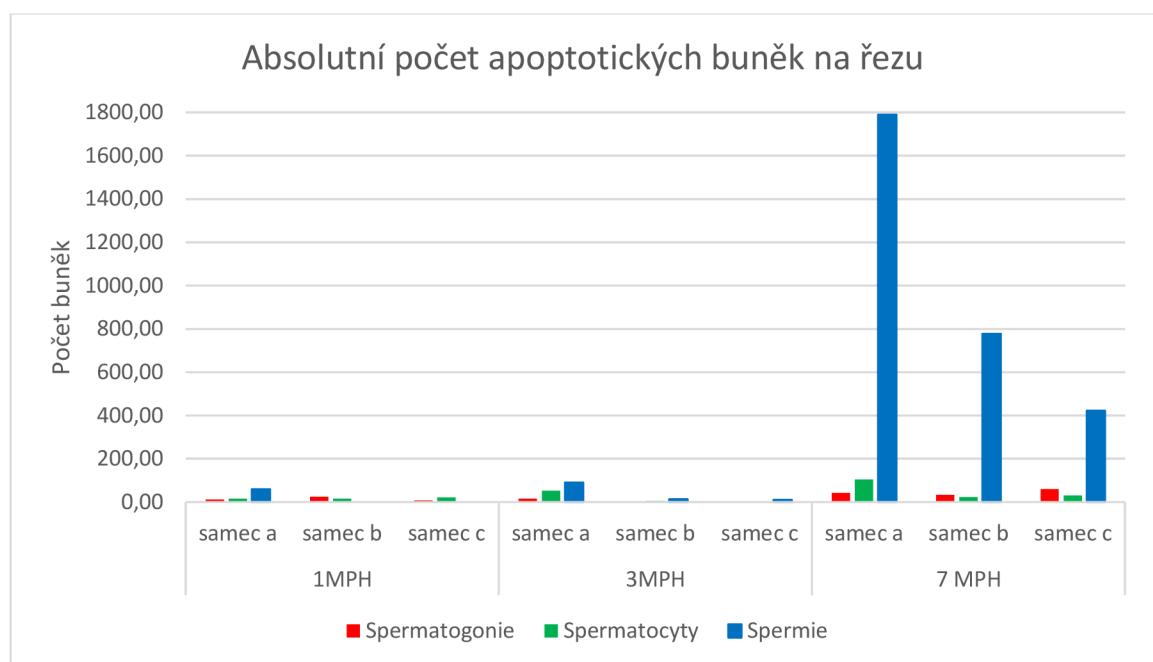
Obrázek 35 zobrazuje identifikaci apoptotických buněk v testes halančíka tyrkysového pomocí kitu Click-iT™ Plus TUNEL Assay Kits for In Situ Apoptosis Detection. A) Samec ve stáří jednoho měsíce od vykolení. A1) Barvení jader buněk pomocí DAPI. A2) Detekce apoptotických buněk v testes, kdy bílé šipky ukazují na apoptotické spermatogonie. A3) Sloučený kanál. B) Samec ve stáří 7 měsíců od vykolení. B1) Barvení jader buněk pomocí DAPI. B2) Detekce apoptotických buněk, kdy bílá šipka označuje apoptotickou spermatogonii a žluté šipky označují apoptotické spermie. B3) Sloučený kanál.

Pro detekci apoptotických buněk v testes (Tunel) byly zpracováni 3 samci v jednom, třech a v sedmi měsících věku, kdy se počítal absolutní počet apoptotických buněk na celém řezu, který byl poté přepočítán na relativní počet těchto buněk na 1mm² plochy testes, protože velikost testes u ryby v jednom a v sedmi měsících je velmi rozdílný. Absolutní počty jsou znázorněny na obrázku 36, relativní přepočet pak na obrázku 37.

U ryb v jednom měsíci byla detekce apoptózy především u spermií, kdy jejich průměrná absolutní hodnota byla $15 \pm 8,68$. Relativní výpočet vyšel v průměru nejvyšší opět u spermií, a to $19,61 \pm 33,96$. Během třetího měsíce byla nejvyšší průměrná absolutní

hodnota u spermií, $132 \pm 32,37$, dále pak u spermatocytů, $43 \pm 18,36$ a nakonec u spermatogonií, $22 \pm 8,68$. Při relativním přepočtu bylo v průměru $13,40 \pm 19,47$ spermatocytů v apoptóze, spermií bylo ovšem dvakrát tolik, tedy $37,82 \pm 44,89$. V závěru sedmého měsíce se absolutní množství apoptotických spermií vyšplhalo v průměru na 605 buněk ± 204 . Na rozdíl od třetího měsíce byly druhé nejpočetnější apoptotické buňky spermatogonie, v průměru $34 \pm 17,94$. V relativním přepočtu bylo průměrné množství apoptotických spermií $996,28 \pm 709,59$.

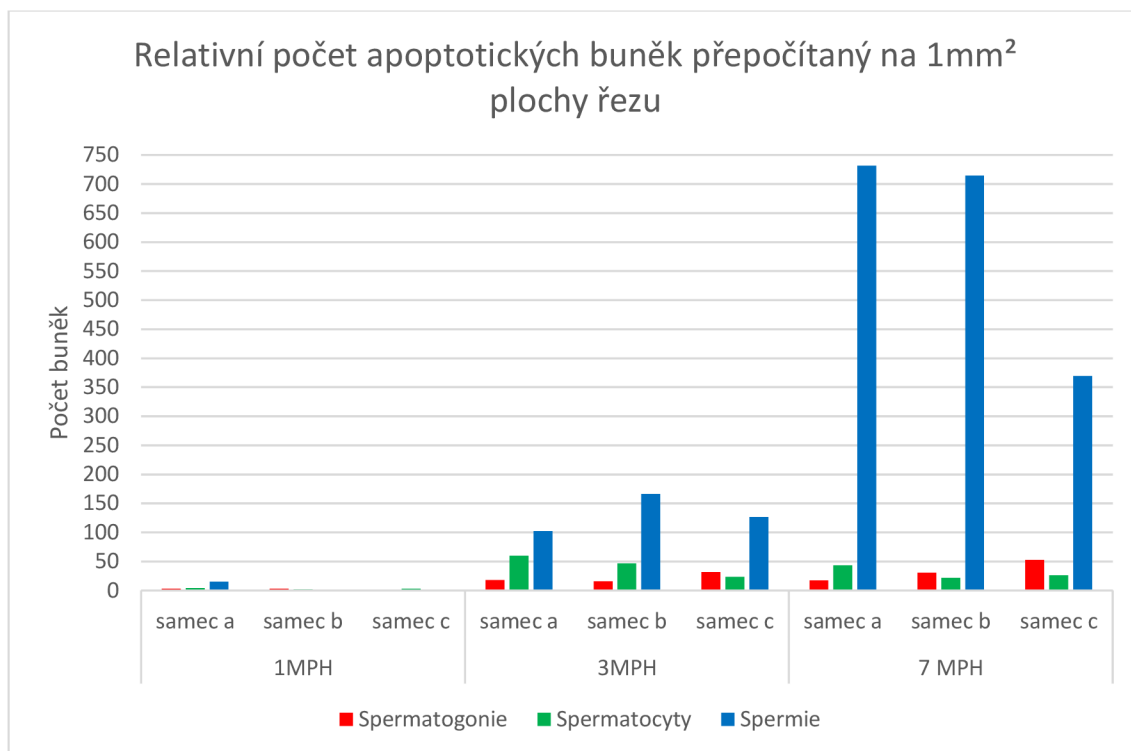
Na tabulkách 5 a 6 jsou porovnány anovy absolutních a relativních počtů. P hodnota u absolutních počtů je 0,012, tedy 1,2 % a u relativních hodnot je p 0,092, tedy 9,2 %.



Obrázek 36: Absolutní počet apoptotických buněk u jednotlivých samců

Zdroj: vlastní

Na obrázku 36 jsou znázorněny průměrné absolutní hodnoty u jednotlivých skupin v závislosti na věku ryb v měsících, vždy ve třech řezech v daném období.



Obrázek 37: Relativní počet apoptotických buněk u jednotlivých samců

Zdroj: vlastní

Obrázek 37 znázorňuje přepočítané relativní počty apoptotických buněk na 1 mm² v závislosti na věku ryb, vždy ve třech řezech na každé období.

Tabulka 5: ANOVA absolutních počtů

Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F krit
Mezi výběry	303427,5	2	151713,8	5,264459	0,012716	3,402826
Všechny výběry	691643,8	24	28818,49			
Celkem	995071,3	26				

Zdroj: vlastní

Tabulka 6: ANOVA relativních počtů

Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F krit
Mezi výběry	634363	2	317181,5	2,62714	0,092953	3,402826
Všechny výběry	2897583	24	120732,6			
Celkem	3531946	26				

Zdroj: vlastní

8 Diskuze

Vývoj gonád halančíka tyrkysového je nejrychlejší u všech nám známých obratlovců, to dokazují i naše data, které ukazují, že většina jedinců měla po prvním měsíci od vykulení vyvinuté gonády schopné tvořit gamety daného pohlaví, na základě přítomnosti buněk schopných tvořit plnohodnotné gamety. Vzhledem k tomu, že jsou ryby teoreticky schopné se rozmnožovat se už po 22 dnech, dá se předpokládat, že při ideálních podmínkách je možné v rámci dvou měsíců rozmnožit dvě generace halančíků, pokud samozřejmě nebudeme brát v úvahu potřebu embryí projít stádiem diapauzy, kdy její délka může být velmi individuální. Blízký příbuzný halančíka tyrkysového, medaka japonská neboli halančík rýžovištní, žije v přírodě v odlišných jiných podmínkách a jeho život není ovlivněn vysycháním tůní. I díky tomu není nucen tak rychle dospět, jeho pohlavní zralost nastává okolo 2-3 měsíců. Délka života je také delší, a to až 2 roky v zajetí (Murata et al., 2019). Podobně rychlý vývoj gonád jako u halančíka tyrkysového je zaznamenán i u tropické mořské ryby z rodu *Schindleria*, ovšem na rozdíl od halančíků, kteří jsou plnohodnotní jedinci ve všech ohledech, tyto ryby mají sice vyvinuté gonády, ale zbytek těla vykazuje spíše larvální stadia ryb (Vrtílek et al., 2018). Nejznámější modelový organismus mezi savci je myš domácí (*Mus musculus*), u které samci pohlavně dospívají ve stáří pěti týdnů a samice ve věku šesti týdnů (Jarmiřová, 2013), ovšem při porovnání, v jakém stádiu se rodí myš a v jakém se kulí halančík, má halančík stále velký náskok. Halančík tyrkysový je jedinečný i v dalším ohledu, dle zkoumaných histologických preparátů lze předpokládat, že se většina z nich kulí s již s diferenciovaným pohlavím, což u ryb není zcela běžné. Neplatí to u všech čerstvě vylíhnutých halančíků, u zbytku se pohlaví diferenciuje během několika hodin až dní. Na rozdíl od dána pruhovaného (*Brachydanio rerio*), kteří se všichni kulí s nediferenciovanou gonádou obsahující primordiální gonocyty, která v průběhu 2-4 týdnů života prochází stádiem juvenilního ovária u všech ryb. Následná míra apoptózy primárních oocytů určuje, zdali bude udrženo ováriální osud gonády. V případě vysoké apoptózy oocytů dochází k diferenciaci na samčí gonádu. K pohlavní dospělosti dochází mezi 2 a 3 měsícem věku v závislosti na podmínkách hcovu (Ye a Chen, 2020).

Pokud porovnáme poměr zárodečné a pojivové tkáně u halančíka a dalšího modelového organismu Bojovnice pestré (*Betta splendens*) dle výzkumu A.D. Woodheda zjistíme, že bojovnice měli poměr těchto tkání v období jednoho roku stejný jako u halančíka v období 2-4 měsíců po vylíhnutí, a to zhruba 10% pojivové tkáně. Po období

nejintenzivnějšího rozmnožování měli poměr tkání velice podobný, okolo 20-30 %, avšak u halančíka bylo toto období ve stáří 6 měsíců po vylihnutí a v případě bojovnice u jedinců starších 1 roku. Ovšem halančík je v 6 měsících již téměř na konci života, na rozdíl od bojovnice, která se běžně dožívá i 5 let. (Woodhead, 1974). Díky tomu lze tvrdit, že halančík je mimořádně vhodným druhem pro studium stárnutí reprodukční soustavy, jelikož k výrazným změnám dochází již v řádu měsíců. Stejný autor provedl tuto studii u jiného druhu, a to Živorodky duhové (*Poecilia reticulata*), u které se v období 2 měsíců po vylihnutí nacházelo srovnatelné množství pojivové tkáně jako u stejně starých jedinců halančíka a to okolo 10 %. Rozdíl byl u starších jedinců, kdy množství tkáně u halančíka stoupalo s dalšími měsíci dál a u živorodky zůstávalo zhruba konstantní až do věku dvou let, kdy pojivová tkáň rapidně vrostla na v průměru na 32 % (Woodhead a Ellett, 1969). Tedy na hodnoty, které jsme u halančíku nenaměřili, protože se žádný nedožil déle než 10 měsíců a nemohli být tím pádem měřeni ve starším věku. Tato skutečnost může být zapříčiněna tím, že stárnutí zárodečných buněk a celých testes bude do určité míry probíhat autonomně, nicméně další postup nebude možné pozorovat z důvodu úmrtí pozorovaných jedinců.

Proliferační antigen buněčného jádra – PCNA, který je schopný detekovat aktivní buňky nenabyl nejvyšších hodnot během prvního měsíce, jako všechny ostatní testy ukazující na plochu zárodečných buněk, ale až během druhého měsíce, a to z důvodu, že během prvního měsíce je například největší poměr zárodečné tkáně, ale tato tkáň nemusí být ve své maximální aktivitě. To může být zapříčiněno tím, že jedinci stále investují více energie do somatického růstu. Nejvyšší aktivita PCNA nastává právě během druhého měsíce, kdy jsou ryby nejvíce sexuálně aktivní. Aktivita pohlavních buněk začíná klesat během čtvrtého měsíce, a to poměrně strmě, jelikož v tomto období již začínají tůně v přirozeném prostředí těchto ryb obvykle vysychat a vysoká sexuální aktivita je tudíž zbytečná. PCNA klesá i v dalších měsících ale již pomaleji a postupně a během desátého měsíce již téměř nulová, protože jak již bylo řečeno, většina jedinců se tohoto věku ani nedožije.

Při detekci buněk v apoptóze bylo nutné absolutní počet přepočítat i na relativní hodnoty, jelikož velikost testes u dvacetidenního jedince a u jedince šestiměsíčního je velice rozdílný a absolutní hodnoty by tím byly zkreslené. Během prvních měsíců byly počty buněk v apoptóze podle očekávání nízké a zanikaly především spermatocyty a spermatogonie. To se změnilo již během třetího měsíce, kdy nejvíce zanikaly spermie,

ale rozdíl mezi apoptotickými spermii a jinými buňkami v apoptóze nebyl příliš velký. V kritickém sedmém měsíci už vcházely do apoptózy všechny buňky ve velkém počtu, ale i tak nejvíce zastoupily spermie, jejichž počet se blížil téměř jednomu tisíci.

Díky anodě jsme byli schopni zhodnotit námi dané hypotézy, kdy u PCNA pozitivní plochy byla nulová hypotéza postavena na nepřítomnosti vztahu mezi věkem ryby a průměrem ploch aktivních PCNA, avšak díky výsledkům jsme byli schopni tuto hypotézu vyloučit, tento výsledek byl poměrně logický, protože se předpokládá menší aktivita buněk v testes u starších ryb. Zde byl nulovou hypotézou také předpokládán nulový vztah mezi věkem a množstvím apoptotických buněk. V absolutních počtech jsme tuto hypotézu vyvrátili, ze stejného důvodu jako u PCNA pozitivní plochy, avšak po přepočítání na relativní hodnoty se nám tuto hypotézu nepodařilo vyvrátit, tudíž se dá předpokládat, že relativní počet apoptotických buněk není závislý na věku.

9 Závěr

V teoretické části mé bakalářské práce jsem se seznámila s obecnou fyziologií buňky, včetně jejího zániku, pohlavní soustavou u ryb a základními histologickými technikami. V praktické části jsem si osvojila chov a rozmnožování halančíků a jejich přípravu pro histologické zpracování a práci se samotnými preparáty. V neposlední řadě jsem získala zkušenosti s mikroskopy, a to jak světelnými, tak fluorescenčními.

Pro výzkum vývoje gonád bylo zpracováno 115 samic, z nichž 17 samic v období 22. dne po vylíhnutí. Z těchto 17 samic mělo 82 % vitelogenní oocyty, tedy pokročilé stádium oogeneze. Skupina samců obsahovala 118 jedinců, z nichž bylo 13 samců zpracováno taktéž v období 22. dne po vylíhnutí, při čemž byly spermie poprvé viděny i u jedince v 18 dnech po vylíhnutí, i když to byl jen výjimečný úkaz. Většina, tedy 77 % měla v testes převážně sekundární spermatocyty, ze kterých vznikají spermie.

Plocha zárodečné tkáně během prvního měsíce byla téměř 100 %, konkrétně 96,8 %. Pozitivní PCNA plocha u samců byla během prvního měsíce $15,9 \% \pm 3,33 \%$. Detekce apoptotických buněk u měsíc starých ryb byla velmi nízká, spermatogonií v průměru $2,33 \pm 1,15$, nejvíce byly v apoptóze spermie v průměru $5 \pm 8,66$, ovšem u dvou ze tří řezů nebyla nalezena spermie ani jedna a pouze u jediného jich bylo nalezeno 15.

Pohlavní senescence u samců v období 3 měsíců je vidět na detekci apoptotických buněk, kdy byla nejvyšší průměrná absolutní hodnota u spermií, a to $132 \pm 32,37$. PCNA pozitivní plocha začala výrazně klesat mezi 2. a 4. měsíce až na $9,71 \% \pm 1,67 \%$. Poměr zárodečného epitelu a pojivové tkáně s prázdnými spermatocystami klesal ve stejném období i tempu s PCNA na $78,66 \% \pm 9,05$ a průměrná plocha pojivové tkáně se zvedla na $21,34 \% \pm 9,05$. U PCNA pozitivní plochy, se předpokládalo, že věk ryby neovlivňuje poměr aktivních buněk, tato hypotéza byla díky anově vyloučena, jelikož hodnota p menší než 0,05, konkrétně $1,53 \cdot 10^{-11}$. Ohledně počtu apoptotických se předpokládalo, že s věkem nebudou počty apoptotických buněk klesat, u absolutních počtů se tato hypotéza vyvrátila, jelikož hodnota p byla 0,012, ovšem po přepočtu na relativní hodnoty se tuto hypotézu nepodařilo vyvrátit, protože p hodnota byla 0,092.

V sedmém měsíci byla apoptóza spermií na vrcholu, a dosáhla hodnot v průměru 605 buněk ± 204 a poměr zárodečné a pojivové tkáně se lehce zvedl na $83,58 \% \pm 7,56$

zárodečné tkáně ku $16,42 \% \pm 7,56$ pojivové tkáně. PCNA pozitivní plocha postupně klesla na $5,12 \% \pm 3,38 \%$.

V souhrnu použité analýzy ukázaly, že období mezi prvním a druhým měsícem po vykulení je u samců téměř bez degradace testes, nicméně od 4 měsíců od vykulení dochází k rapidnímu nárůstu plochy pojivové tkáně v testes v neprospěch zárodečného epitelu. Tento jev postihuje spíše centrální část testes, kde se nacházejí odvodné kanálky, případně spermatocysty s již pokročilými stádii spermatogeneze. Nicméně i analýza aktivních spermatocyst se syntézou DNA pomocí PCNA protilátky, které se nacházejí zejména na periférii testes, ukázala že vrcholu je dosaženo u samců ve 2 měsících věku a následně dochází k několikanásobnému poklesu s přibývajícím věkem až téměř do úplného vymizení, kdy u jedince 10 MPH bylo na celém řezu detekováno pouze několik jednotlivých buněk. Na základě získaných dat lze tvrdit, že mimo již popsané reprodukční senescence (počet vyprodukovaných embryí) (Žák et al., 2021), dochází i k negativním změnám na orgánové a buněčné úrovni, kdy dochází k buněčné smrti a snížení aktivity zárodečných buněk s přibývajícím věkem.

10 Bibliografie

- ALBERTS, B., 2004. *Essential Cell Biology*. 2. New York: Garland Science. ISBN 80-902906-2-0.
- BALON, E., 1975. Reproductive Guilds of Fishes: A Proposal and Definition. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* [online]. 6(32), 821-864 [cit. 2022-01-02]. DOI: 10.1139/f75-110 . Dostupné z: <https://sci-hub.se/10.1139/f75-110>
- CARNEIRO, J., JUNQUEIRA, L., 1997. *Základy histologie*. 1. Praha: H&H nakladatelství.
- COSSON, J. et al., 2008. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. *Journal of Applied Ichthyology* [online]. 24(4), 460-486 [cit. 2022-04-20]. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2008.01151.x. ISSN 01758659. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0426.2008.01151.x>
- DEVLIN, R., NAGAHAMAB, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* [online]. 191-364 [cit. 2022-01-02]. DOI: 10.1016/S0044-8486. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00057-1)
- DOMÍNGUEZ-CASTANEDO, O., URIBE, M., 2019. Ovarian structure, folliculogenesis and oogenesis of the annual killifish *Millerichthys robustus* (Cyprinodontiformes: Cynolebiidae). *Journal of Morphology* [online]. 280(3), 316-328 [cit. 2021-11-05]. DOI: 10.1002/jmor.20945. ISSN 03622525. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmor.20945>
- DVOŘÁK, P., PYSZKO, M., VELÍŠEK, J., DVOŘÁKOVÁ LÍŠKOVÁ, Z., ANDREJI, J., 2020. *Anatomie a fyziologie ryb*. 2. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany. ISBN 978-80-7514-109-5.
- GRUZDEVA, M., MALYUTINA, A., KUZISHCHIN, K., 2013. Regularities of the life history strategy adoption in masu salmon *Oncorhynchus masou* from the Kol River (Western Kamchatka) in regard to the processes of growth and sexual maturation. *Journal of Ichthyology* [online]. 2013(74), 585-599 [cit. 2022-01-02]. DOI: S0032945213050056. Dostupné z: <https://doi.org/10.1134/S0032945213050056>
- HORKÝ, D., ČECH, S., 2007. *Základy histologické techniky pro zdravotní laboranty*. 1. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4467-8.
- HORTON, N., MATHEW, S., MATHEW, P., AHLENSTIEL, G., 2013. Novel Interaction between Proliferating Cell Nuclear Antigen and HLA I on the Surface of Tumor Cells Inhibits NK Cell Function through NKp44. *PLoS ONE*. 8(3). DOI: 10.1371/journal.pone.0059552. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0059552>
- JARMIČOVÁ, P., 2013. *Regulace reprodukční fyziologie myši domácí pachovými signály*. Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.
- JUBB, R., 1971. A new *Nothobranchius* (Pisces, Cyprinodontidae) from Southeastern Rhodesia. *American Killifish Association*. 1971(8), 12-19.
- LEAL, M. et al., 2009. Histological and Stereological Evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) Spermatogenesis with an Emphasis on Spermatogonial Generations 1. *Biology of Reproduction*

[online]. 81(1), 177-187 [cit. 2021-11-05]. DOI: 10.1095/biolreprod.109.076299. ISSN 0006-3363. Dostupné z: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.109.076299>

LUBZENS, E., YOUNG, G., BOBE, J., CERDA, J., 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*. 2010(165), 367-389.

MAGAKI, S., HOJAT, S., WEI, B., SO, A., YONG, W., 2019. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Biobanking*. New York, NY: Springer New York, 289-298. Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-4939-8935-5_25. ISBN 978-1-4939-8933-1. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8935-5_25

MURATA, K., WOLF, M., 2018. Cryo-electron microscopy for structural analysis of dynamic biological macromolecules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1862(2), 324-334. DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.07.020. ISSN 03044165. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416517302374>

MURATA, K., KINOSHITA, M., TANAKA, M., 2019. *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols*. 2. UK: Wiley-Blackwell. ISBN 978-1-119-57529-0.

OTOVÁ, B., KOHOUTOVÁ, M., PANCZAK, A., 2008. *Lékařská biologie a genetika*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1594-3.

PA5-30749 [online], 2022. [cit. 2022-04-10]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/antibody/product/DDX4-Antibody-Polyclonal/PA5-30749>

PARRA, E. et al., 2017. Validation of multiplex immunofluorescence panels using multispectral microscopy for immune-profiling of formalin-fixed and paraffin-embedded human tumor tissues. *Scientific Reports*. 7(1). DOI: 10.1038/s41598-017-13942-8. ISSN 2045-2322. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-13942-8>

POLAČIK, M., REICHARD, M., 2010. Diet overlap among three sympatric African annual killifish species *Nothobranchius* spp. from Mozambique. *Journal of Fish Biology* [online]. - [cit. 2021-10-10]. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2010.02717.x. ISSN 00221112. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1095-8649.2010.02717.x>

POLAČIK, M., ŽÁK, J., 2018. Ekologie anuálních halančků aneb jak žijí laboratorní ryby v přírodě. *Akvárium*. (39), 44-53.

POLAČIK, M., BLAŽEK, R., REICHARD, M., 2016. Laboratory breeding of the short-lived annual killifish *Nothobranchius furzeri*. *Nature Protocols* [online]. 11(8), 1396-1413 [cit. 2022-02-01]. DOI: 10.1038/nprot.2016.080. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nprot.2016.080>

POLAČIK, M., REICHARD, M., LIU, Z., 2011. Asymmetric Reproductive Isolation between Two Sympatric Annual Killifish with Extremely Short Lifespans. *PLoS ONE* [online]. 6(8) [cit. 2021-10-10]. DOI: 10.1371/journal.pone.0022684. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0022684>

POLLARD, T., EARNSHAW, W., LIPPINCOTT-SCHWARZ, J., JOHNSON, G., 2016. *Cell Biology*. Amsterdam: Elsevier Books. ISBN 9780323341264.

- SCHULZ, R., DE FRANCA, L., LAREYRE, J., LEGAC, F., 2010. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*. 2010(165), 390-411.
- SIVAKUMARANA, K., BROWNB, P., STOESSEL, D., 2003. Maturation and reproductive biology of female wild carp, *Cyprinus carpio*, in Victoria, Australia. *Environmental Biology of Fishes*. 68(68), 321–332.
- SUNDARARAJ, B., 1981. *Reproductive Physiology of Teleost Fishes: A Review of Present Knowledge and Needs for Future Research*. 1. Roma, Italy: Via delle Terme di Caracalla. ISBN 92-5-101145-1.
- TERZIBASI TOZZINI, E., CELLERINO, A., 2020. Nothobranchius annual killifishes. *EvoDevo* [online]. 11(1), 10-15 [cit. 2021-11-04]. DOI: 10.1186/s13227-020-00170-x. ISSN 2041-9139. Dostupné z: <https://evodevojournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13227-020-00170-x>
- VALDESALICI, S., CELLERINO, A., 2003. Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* [online]. 270(2) [cit. 2021-11-04]. DOI: 10.1098/rsbl.2003.0048. ISSN 0962-8452. Dostupné z: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsbl.2003.0048>
- VALENZANO, D. et al., 2015. The African Turquoise Killifish Genome Provides Insights into Evolution and Genetic Architecture of Lifespan. *Cell* [online]. 163(6), 1539-1554 [cit. 2022-04-20]. DOI: 10.1016/j.cell.2015.11.008. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415014889>
- VÍTEK, J., KADLEC, J., 2001. *Halančiči: biologie, chov, přehled druhů*. Cheb: Svět křídel. ISBN 80-852-8076-0.
- VRTÍLEK, M., ŽÁK, J., PŠENIČKA, M., REICHARD, M., 2018. Extremely rapid maturation of a wild African annual fish. *Current Biology* [online]. 28(15), 822-824 [cit. 2022-04-22]. DOI: 10.1016/j.cub.2018.06.031. ISSN 09609822. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982218308224>
- WOODHEAD, A., 1974. Ageing changes in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. I. The testis. *Exp. Geront.* GB, (9), 75-81. DOI: 10.1016/0531-5565(74)90010-2.
- WOODHEAD, A., ELLETT, S., 1969. Endocrine aspects of ageing in the guppy, *Lebistes reticulatus* (Peters). *Experimental Gerontology*. 4(1), 17-25. DOI: 10.1016/0531-5565(69)90022-9. ISSN 05315565. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0531556569900229>
- XIE, X., NÓBREGA, R., PŠENIČKA, M., 2020. Spermatogonial Stem Cells in Fish: Characterization, Isolation, Enrichment, and Recent Advances of In Vitro Culture Systems. *Biomolecules* [online]. 10(4) [cit. 2021-11-04]. DOI: 10.3390/biom10040644. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/4/644>
- YE, M., CHEN, Y., 2020. Zebrafish as an emerging model to study gonad development. *Computational and Structural Biotechnology Journal* [online]. 18, 2373-2380 [cit. 2022-04-22]. DOI: 10.1016/j.csbj.2020.08.025. ISSN 20010370. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2001037020303780>

ŽÁK, J., GVOŽDÍK, L., 2019. Co je moc a co je málo aneb teplotní nároky mosambických anuálních halančíků. *Akvárium*. (43), 10-14.

ŽÁK, J., DYKOVÁ, I., REICHARD, M., 2020. Good performance of turquoise killifish (*Nothobranchius furzeri*) on pelleted diet as a step towards husbandry standardization. *Scientific Reports* [online]. 10(1) [cit. 2022-04-20]. DOI: 10.1038/s41598-020-65930-0. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-020-65930-0>

ŽÁK, J., REICHARD, M., GAILLARD, J., 2021. Reproductive senescence in a short-lived fish. *Journal of Animal Ecology* [online]. 90(2), 492-502 [cit. 2022-04-20]. DOI: 10.1111/1365-2656.13382. ISSN 0021-8790. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2656.13382>

ŽÁK, J., VRTÍLEK, M., REICHARD, M., 2019. Diel schedules of locomotor, reproductive and feeding activity in wild populations of African annual killifish. *Biological Journal of the Linnean Society* [online]. [cit. 2021-10-10]. DOI: 10.1093/biolinnean/blz108. ISSN 0024-4066. Dostupné z: <https://academic.oup.com/biolinnean/advance-article/doi/10.1093/biolinnean/blz108/5537092>

11 Seznam obrázků

Obrázek 1: Halančík tyrkysový	10
Obrázek 2: Porovnání meiózy a mitózy	15
Obrázek 3: Apoptotická buňka	16
Obrázek 4: Testes porcelánové barvy v dutině břišní	19
Obrázek 5: ovaria jasně žluté barvy	20
Obrázek 6: Analýza obrazu z konfokálního mikroskopu pomocí software FIJI.	32
Obrázek 7: Fáze vývoje ovárií	34
Obrázek 8: morfologické změny testes v průběhu života halančíka tyrkysového	35
Obrázek 9: 0 DPH.....	37
Obrázek 10: 2 DPH	38
Obrázek 11: 4 DPH.....	39
Obrázek 12: 6 DPH.....	39
Obrázek 13: 8 DPH.....	40
Obrázek 14: 10 DPH.....	40
Obrázek 15: 12 DPH.....	41
Obrázek 16: 14 DPH	41
Obrázek 17: 16 DPH.....	42
Obrázek 18: 18 DPH.....	42
Obrázek 19: 22 DPH.....	43
Obrázek 20: 29 DPH.....	43
Obrázek 21: 0DPH.....	44
Obrázek 22: 2 DPH.....	44
Obrázek 23: 4 DPH	45
Obrázek 24: 6 DPH	45
Obrázek 25: 8 DPH.....	46
Obrázek 26: 10 DPH.....	47
Obrázek 27: 12 DPH.....	47
Obrázek 28: 14 DPH.....	48
Obrázek 29: 16 DPH.....	49
Obrázek 30: 18 DPH.....	50
Obrázek 31: 22 DPH.....	51
Obrázek 32: Aktivní proliferace buněk analyzovaná PCNA protilátkou	52
Obrázek 33: Vizualizace segmentace testes pomocí beta actin protilátky	53
Obrázek 34: PCNA pozitivní plocha	55

Obrázek 35: Identifikace apoptotických buněk v testes halančika tyrkysového	56
Obrázek 36: Absolutní počet apoptotických buněk	57
Obrázek 37: Relativní počet apoptotických buněk	58