

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybářství a ochrany vod
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

Demembrance spermií ryb jako nástroj studia fyziologie aktivace
a pohybu spermií ryb

Autor: Jaroslava Blažková

Vedoucí práce: Ing. Marek Rodina, PhD.

Konzultant: Borys Dzyuba, MSc., Ph.D.

Studijní program a obor: Zootechnika, Rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník studia: Třetí

České Budějovice, 2012

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že, v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá 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 kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 4. 5. 2012

.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Marku Rodinovi, Ph.D. za trpělivé vedení a cenné rady. Za pomoc děkuji též svému konzultantovi Borysi Dzyubovi, MSc., Ph.D., za asistenci při provádění pokusů Mgr. Sergeyi Boryshpoletsovi, Ph.D.

Dále bych chtěla poděkovat zejména Bc. Zuzaně Mruzíkové za cenné připomínky, za jazykovou korekci práce Mgr. Danielu Křížovi a Mgr. Lence Ratajové, za pomoc se zpracováním dat Aleně Břendové.

V neposlední řadě děkuji své rodině a všem kamarádům a známým, kteří mě podpořili při psaní této práce.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jaroslava BLAŽKOVÁ**
Osobní číslo: **V09B059P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Demembrance spermií ryb jako nástroj studia fyziologie aktivace a pohybu spermií ryb**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cílem práce je:

- shrnout aktuální informace o této metodě a jejím použití (v cytologii, reprodukční biologii..)
- na jednoduchém experimentu zopakovat a potvrdit základní postup demembrance rybích spermií

Předpokladem je samostatné vyhledání a nastudování cizojazyčné literatury a systematické uspořádání nastudovaných dat.

Pro zpracování teoretické části doporučuji koncipovat práci např. podle schématu:

- rybí spermie - stavba, funkce, fyziologie aktivace a pohybu
- buněčná membrána - stavba funkce, fyziologie a mechanismy přenosu látek přes membránu
- demembrance - publikované způsoby, postupy a využití u rybích spermií popř. i jiných buňek
- návrh příkladu využití při studiu fyziologie aktivace pohybu rybích spermií

Pro praktický experiment doporučuji zvolit jednoduché schéma:

Porovnání parametrů pohyblivosti nativních a demembranovaných spermií zvoleného druhu (druhů).

Rozsah grafických prací: **max. 20 stran**
Rozsah pracovní zprávy: **max. 40 stran**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Marek Rodina, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant bakalářské práce: **MSc. Borys Dzyuba, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Datum zadání bakalářské práce: **30. listopadu 2010**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2012**


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zatiší 728/II
389 25 Vodňany (2)


doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. ledna 2011

Příloha zadání bakalářské práce

Seznam odborné literatury:

- Linhart O, Šlechta V., Slavík T, 1991: Fish sperm composition and biochemistry, Bulletin of Institut of Zoology, Academia Sinica, monograph.16, 288-311
- Alavi, S.M.H., Cosson, J.J., Coward, K., Rafiee, G., 2008. Fish Spermatology. Alpha Science Ltd, Oxford, UK. pp. 465. ISBN 978-1-84265-369-2.
- Linhart, O; Cosson, J; Mims, SD; Rodina, M; Gela, D; Shelton, WL : Effects of ions on the motility of fresh and demembrated spermatozoa of common carp (Cyprinus carpio) and paddlefish (Polyodon spathula) FISH PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 28 (1 4): 203 205 2003
- Williams, KM; Ford, WCL : The motility of demembrated human spermatozoa is inhibited by free calcium ion activities of 500 nmol/L or more INTERNATIONAL JOURNAL OF ANDROLOGY, 24 (4): 216 224 AUG 2001
- Bezanehtak, H; Swan, MA : Study of demembrated, reactivated human spermatozoa with decondensed nuclei JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY, 284 (7): 789 797 DEC 1 1999
- Author(s): Brokaw, CJ: Bending patterns of ATP reactivated sea urchin sperm flagella following high salt extraction for removal of outer dynein arms , CELL MOTILITY AND THE CYTOSKELETON, 42 (2): 125 133 1999
- Author(s): Ashizawa, K; Sakuragi, M; Tsuzuki, Y: Temperature dependent flagellar motility of demembrated, cytosol free fowl spermatozoa COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY A MOLECULAR AND INTEGRATIVE PHYSIOLOGY, 121 (1): 83 89 SEP 1998
- Author(s): Poupard, GP; Gatti, JL; Cosson, J; Jeulin, C; Fierville, F; Billard, R: Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa JOURNAL OF REPRODUCTION AND FERTILITY, 110 (2): 315 327 JUL 1997
- COSSON, MP; COSSON, J; ANDRE, F; BILLARD, R: CAMP/ATP RELATIONSHIP IN THE ACTIVATION OF TROUT SPERM MOTILITY THEIR INTERACTION IN MEMBRANE DEPRIVED MODELS AND IN LIVE SPERMATOZOA : CELL MOTILITY AND THE CYTOSKELETON, 31 (2): 159 176 1995

OBSAH

1. Úvod.....	8
2. Literární přehled.....	9
2.1. Spermie ryb.....	9
2.1.1. Stavba spermie.....	9
2.1.1.1. Hlavička spermie.....	9
2.1.1.2. Střední oddíl.....	10
2.1.1.3. Bičík.....	11
2.1.1.4. Pohybový aparát bičíku.....	11
2.1.1.5. Rozdíly mezi stavbou spermie kostnatých a chrupavčitých ryb,.....	13
2.1.1.6. Rozdíly ve stavbě spermií dle způsobu oplození.....	14
2.1.1.7. Semenná plazma.....	15
2.2. Pohyb spermií.....	15
2.2.1. Aktivace pohybu.....	15
2.2.1.1. Faktory aktivující pohyb.....	15
2.2.1.2. Hyperpolarizace membrány a produkce cAMP.....	17
2.2.1.3. Aktivace axonemálního pohybu.....	18
2.2.2. Obecné charakteristiky pohybu spermií.....	18
2.2.2.1. Typy pohybu, vliv struktury spermie.....	18
2.2.2.2. Doba pohybu, frekvence.....	19
3. Cytoplasmatická membrána.....	19
3.1. Stavba cytoplasmatické membrány.....	18
3.2. Přenos látek přes membránu.....	22
4. Mitochondrie.....	24
4.1. ATP.....	24
4.1.1. Oxidativní fosforylace, mechanismus vzniku ATP.....	25
5. Demembranace spermií.....	25
5.1. Co je demembranace.....	25
5.2. Demembranační média.....	25
5.2.1. Demembranační média.....	25
5.2.2. Reaktivační média.....	26
5.3. Příklady použití demembranace.....	27
5.3.1. Zkoumání vlivu iontů na pohyblivost spermií.....	27

5 3.2. Zkoumání vlivu ATP a cAMP na pohyblivost spermií.....	29
5.3.3. Zkoumání vlivu teploty na demembranované spermie kura domácího.....	30
3. Materiál a metodika.....	31
4. Výsledky.....	34
5. Diskuze.....	39
6. Závěr.....	41
7. Přehled použité literatury.....	42
8. Seznam vybraných zkratk.....	44
9. Seznam použitých tabulek a obrázků.....	44
10. Abstrakt.....	45
11. Abstract.....	47

1. Úvod

V dnešní době, kdy vlivem vysokého komerčního tlaku, výstavby rybářských bariér a znečišťování vodního prostředí klesá početnost rybích populací ve volné přírodě, dochází k narušování věkových struktur těchto populací, a tím i ke snížení či úplnému znemožnění přirozené reprodukce ryb (podle webu¹).

Ochrana mizejících rybích druhů a stále rostoucí popularita intenzivních chovů svědčí o potřebnosti výzkumu na poli umělé reprodukce ryb ať už z důvodů jejich záchrany či za účelem případného komerčního využití (podle webu²).

Jedním z významných faktorů ovlivňujících úspěšnost umělého rozmnožování nejenom ryb je kvalita spermatu. Ta je zjišťována za pomoci řady řady parametrů, jako jsou například koncentrace a podíl pohyblivých spermií (v %) ve vybraném vzorku, jejich rychlost, schopnost aktivace, průběh motility, atd. (Alavi et al., 2008) Při použití umělé indukce spermiogeneze však kvalita spermií může být proměnlivá (Redondo et al., 2003).

Pohyb spermií patří mezi fyzikální charakteristiky buněk. Vyvoláván je mimo jiné změnami prostředí, ve kterém se spermie nacházejí (Pšenička et al., 2009). Pohyblivost spermií má vliv na procento oplozených jiker (Cosson et al., 2007).

Motilita spermií je ovlivňována celou řadou faktorů, například obsahem chemických látek v prostředí či množstvím energie dostupným v buňce díky procesu buněčného dýchání. (Alavi et al., 2008). Studium působení chemických látek na pohybový aparát spermie umožňuje mimo jiné metoda demembrace spermií (Linhart et al., 2002).

Cílem této bakalářské práce bylo shrnutí dostupných informací o způsobech demembrace spermií, jejich použití a zopakování některého z nich jednoduchým experimentem na spermiích jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) a kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Tyto druhy byly vybrány jako zástupci dvou odlišných rybích skupin; kapr obecný reprezentoval při pokusech skupinu kostnatých ryb, jeseter malý byl vybrán jako zástupce skupiny chrupavčitých.

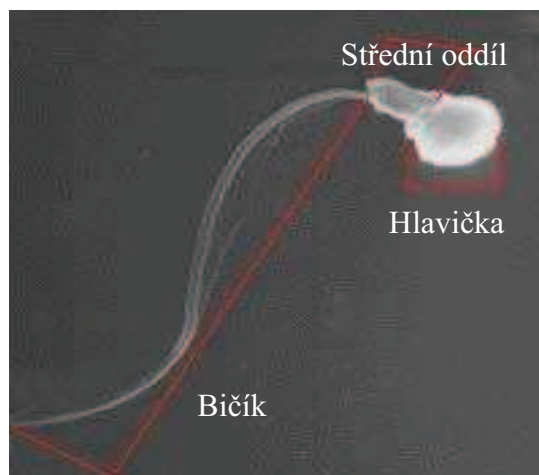
2. Literární přehled

2.1. Spermie ryb

2. 1.1 Stavba spermie

Spermie je samčí pohlavní buňka s haploidní sadou chromozomů. Jejím úkolem je transport genetického materiálu „otce“ do pohlavní buňky samice, do jikry. K tomuto účelu je přizpůsobena i svou stavbou (Alavi et al., 2008).

Základní části samčí gamety jsou hlavička a bičík. U savců a chrupavčitých ryb je hlavička opatřena akrozomem, což je váček obsahující lytické enzymy, které napomáhají spermii v průniku do vajíčka. U některých typů spermií bývá k bičíku přiřazována i střední část s mitochondriemi (Massanyi, 1991). Samotný bičík spermie, plnící funkci pohyblivé části, má stavbu typickou pro eukaryotní organismy, totiž dva centrální mikrotubuly obklopené devíti dvojicemi postranních mikrotubulů. Cytoplazmatická membrána odděluje vnitřní prostředí buňky od jejího okolí (Pšenička et al., 2009).



Obr.1.: Spermie kostnatých ryb (Upraveno podle webu¹)

2.1.1.1. Hlavička spermie

Hlavička spermie nese jadernou hmotu a u chrupavčitých ryb bývá opatřena akrozomem (Alavi et al., 2008). Celá je pokryta buněčnou membránou, která přechází na bičík. Je nositelkou genetické informace (Campbell a Reece, 2008). Může měřit od 1,3 do 35 μm (Alavi et al., 2008).

Část hlavičky opatřená akrozomem bývá označována jako akrozomální. Ta bývá dále členěna na segmenty apikální a ekvatoriální, které se dohromady nazývají *pars anterior* hlavičky. Ekvatoriální úsek bývá též označován

jako *pars intermedialis*. Postakrozomovou oblast hlavičky nazýváme *pars posterior* (Massanyi, 1991).

U chrupavčitých ryb je tvar hlavičky protáhlý, navíc je opatřena akrozomem. U kostnatých ryb je tvar i přítomnost akrozomu variabilní dle příslušnosti ke skupině. Optimální tvar a velikost hlavičky je předpokladem pro správný průnik spermie do jikry (Alavi et al., 2008).

V jádře spermie je uložena genetická informace samce. Od jader somatických buněk se odlišuje tím, že má poloviční obsah DNA a chromatin není uspořádaný do vláknitých struktur, nýbrž tvoří kompaktní masu. Nukleoplazma neobsahuje jadernou tekutinu a připomíná tzv. pyknotické jádro (Massanyi, 1991).

Materiál okolo jádra se nazývá perinukleární substance. V literatuře bývá označována i například jako perforatorium, subakrozomová substance nebo nukleolema atd. (Massanyi, 1991). Jádrem spermií kostnatých ryb proniká kanálek longitudinální osy, který obsahuje mikrotubulární filamenty (Alavi et al., 2008).

Akrozom je cytoplazmatický váček kapkovitého tvaru s laterálními výběžky překrývajícími přední část hlavičky chrupavčitých ryb. Jeho velikost bývá okolo 3 μm (Alavi et al., 2008). Obsahuje lytické enzymy, které se účastní průniku do jikry, a dále dlouhý fertilizační filament se stejným účelem. Jeho absence je u kostnatých ryb kompenzována přítomností mikropylí. Výjimku tvoří jeseteři, u kterých nacházíme kromě akrozomu i několik mikropylí (Pšenička, 2009).

2.1.1.2. Střední oddíl

Střední oddíl spermie je pevně spojený s hlavičkou. V některých pramenech je označován za součást bičíku, protože zde není přesné dělení (Massanyi, 1991). Až na počet mitochondrií, který je u ryb nižší, se podobá střednímu oddílu u gamet savčích samců. Tento oddíl bývá označován jako motor spermie (Pšenička, 2009).

Nachází se zde komplex proximální a distální centrioly, který slouží k ukotvení bičíku, mitochondrie a v případě některých skupin ryb (chrupavčité) i glykogenové granule. (Alavi et al., 2008).

Mitochondrie produkují ATP, které je pro spermii zdrojem energie. Jejich počet je druhově specifický, například u okouna říčního (*Perca fluviatilis*) nalezneme pouze jednu, kdežto u jelce jesena (*Leuciscus idus*) jich může být více než dvacet. U kaprovitých ryb bývá 2 – 10 těchto organel, u jeseterů potom 3 – 8 (Pšenička, 2009).

Od bičíku je střední oddíl separován cytoplazmatickým kanálem, který tvoří vychlípenina cytoplazmatické membrány. Tímto způsobem je oddělena cytoplazma bičíku a středního oddílu (Alavi et al., 2008).

2.1.1.3. Bičík

Bičík je hlavním pohybovým aparátem spermie. Tato organela vznikla z cytoplazmatické membrány. Jeho délka bývá různá. Od 25 μm u lína (*Tinca tinca*) po 94 μm u sumečka skrvnitého (*Ictalurus punctatus*). Fibrilární část je tvořena z jedné dvojice centrálních mikrotubulů a devíti dvojic po obvodu; centrální mikrotubuly ovšem mohou chybět. Bičík takových ryb, například úhoře říčního (*Anguilla anguilla*), má uspořádání 9+0 (Pšenička, 2009).

U spermie se obvykle vyskytuje jeden bičík, mohou se však objevit dva (Pšenička, 2009, Alavi et al., 2008). Dvojici bičíků nalézáme například u žabohlavce svítivého (*Porichthys notatus*) či u sumečka tečkovaného (*Ictalurus punctatus*) (Pšenička, 2009).

Podél bičíků jsou dva laterální lemy, které slouží ke zvýšení síly bičíku. Jsou vytvořené z cytoplazmatické membrány, orientované obvykle podél horizontální osy centrálních mikrotubulů. Tento jev byl zdokumentován například u skupin *Poeciliidae*, *Janysiidae*, a *Patolontidae* (Alavi et al., 2008, Pšenička, 2009).

2.1.1.4. Pohybový aparát bičíku

Vlastním pohybovým aparátem bičíku je axonema. U většiny rybích druhů je tvořena podle schématu 9 + 2 – neboli devět dvojic mikrotubulů po obvodu a jedné centrální dvojice. Výjimku tvoří například úhoř říční, u kterého centrální dvojice mikrotubulů chybí (Pšenička, 2009).

Vnější dvojice tubulů jsou složeny z kompletního A-tubulu a nekompletního B-tubulu a tvoří vysoce organizovanou proteinovou síť. Každý z periferních mikrotubulů nese dvě ramena složená z ATPáz (dyneinů). Po hydrolýze ATP tato dyneinová ramena interagují s proteiny na B-tubulu sousední sady, což umožňuje klouzavý proces. Přítomnost spojovacích momentů způsobuje permanentní posouvání tubulů a tím pádem i napětí, které je zodpovědné za pohyb bičíku (Alavi et al., 2008).

Princip pohonu je založený na sérii otáčejících se motorů (dyneiny s otáčivými rameny), které oživují lineární elementy spolu s alternativním opravným mechanismem (Alavi et al., 2008).

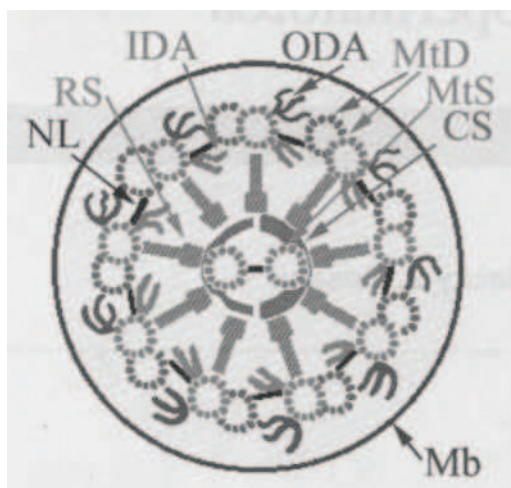
Aktivace axonemy je docíleno fosforylací podjednotek spojených s molekulárními motory, které jsou zahrnuty v signálních drahách buňky vedoucích až ke vzniku pohybu (Alavi et al., 2008).

Každá dvojice tubulů je opatřena dvěma výběžky – dyneiny, fungujícími jako energetické generátory závislé na mikrotubulech. U lososovitých jsou tyto dyneiny tvořeny ze dvou velkých bílkovinných řetězců (~ 500kDa), šesti středních řetězců (60 -120 kDa) a šesti lehkých řetězců (8 - 30 kDa) (Alavi et al., 2008).

Velké (těžké) dyneinové řetězce jsou proteiny s vysokou molekulovou hmotností. Mají funkci motoru pohyblivých molekul. Jsou členy proteinové superrodiny AAA a obsahují čtyři smyčky s navázaným ATP. Struktura středních řetězců není dosud zcela popsána (Alavi et al., 2008).

Vnější dyneinová ramena vystupují z tubulů v pravidelných intervalech (24 nm). Nacházíme zde několik proteinů: DC1 a DC2, které mohou být zapojené ve škále bílkovin navázaných na vnější dyneinová ramena, DC 3–4, EF – pomocné motivy s možností navázání Ca^{2+} a regulační funkcí. Identifikováno bylo šest různých proteinů z vnějších slabších dyneinových řetězců, z nichž ne všechny jsou popsány. Nachází se zde např. proteiny LRR bohaté na aminokyselinu leucin (Alavi et al., 2008).

Vnitřní dyneinová ramena jsou komplexnější než ta vnější. Zahrnují molekuly s dlouhými řetězci. U úhořů se morfologicky dělí na tři druhy, u tresek je ve vnitřních ramenech přítomen aktin (Alavi et al., 2008).



Obr.2.: Schéma hlavních strukturních součástí axonemy:

NL – nexinová ramena spojující sousední dvojice mikrotubulů, RS – ramena spojující centrální struktury s periferními, IDA – vnitřní dyneinová ramena, ODA – vnější dyneinová ramena,

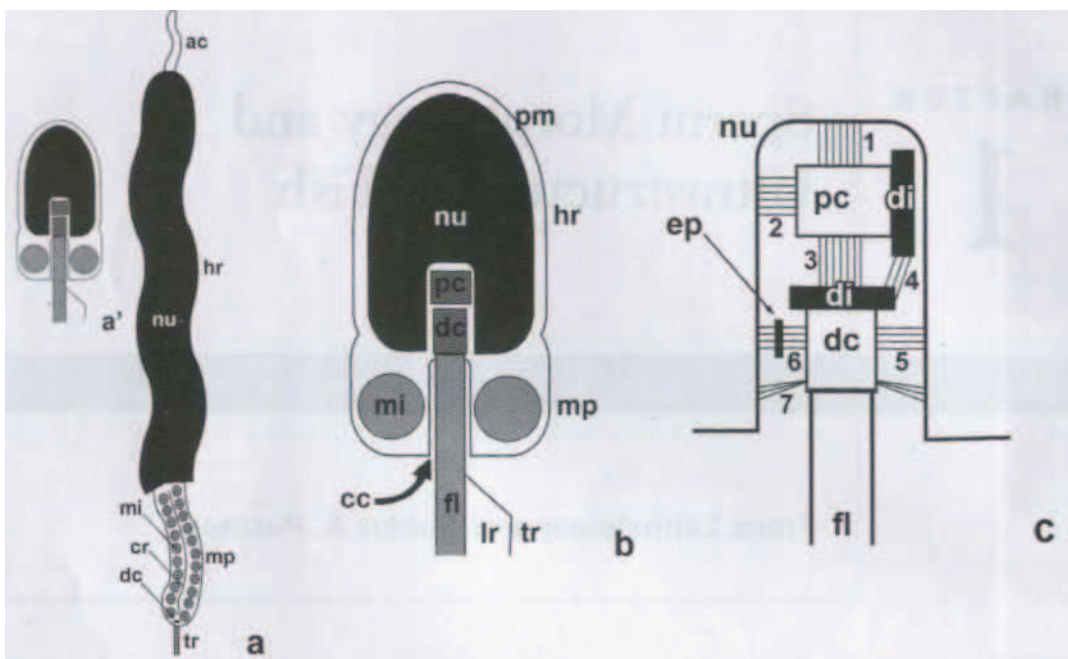
MtD – periferní mikrotubuly, MtS – centrální mikrotubuly, CS – centrální oblast bičíku, Mb – plazmatická membrána bičíku. (Podle Alaviho et al., 2008)

2.1.1.5. Rozdíly mezi stavbou spermií kostnatých a chrupavčitých ryb

Tvar a stavba samčích pohlavních buněk ryb závisí na příslušnosti k taxonomické skupině i na způsobu oplození (Alavi et al., 2008).

Spermie chrupavčitých ryb se sestávají z výše popsaných částí: hlavičky, akrozomu, středního oddílu a bičíku. Jejich struktura je jednotná, což znamená, že odlišnosti nacházíme pouze ve struktuře centriolárního komplexu a bičíku. Akrozom, hlavička i střední oddíl mají helikální tvar (Alavi et al., 2008).

U kostnatých ryb je struktura spermií diverzifikovanější. Jejich spermie jsou obecně členěny na hlavičku, střední oddíl a bičík. U skupin *Actinisia* (nozdratí, synonymum svaloploutví (*Sarcopterygii*)), *Dipnoi*, (dvojdyšní), *Clasdistia* (syn. *Brachiopterygii*, bichři) nacházíme akrozom, jejich spermie mají prodlouženou hlavičku. Obecným znakem podtřídy *Neopterygii* (mnohokostnatí) je absence akrozomu, hlavička je u těchto ryb kulovitá (Alavi et al., 2008, Pšenička, 2009).



Obr.3.: Rozdíly ve stavbě spermií chrupavčitých a kostnatých ryb

a) spermie chrupavčitých ryb v porovnání se spermií kostnatých (a'), b) spermie kostnatých, c) centriolární komplex spermie kostnatých se stabilizačními strukturami (nejsou přítomny u každého druhu); Vysvětlivky: ac – akrozom, cc- cytoplazmatický kanál, cr – centrální osa souměrnosti středního oddílu, dc – distální centriola, di – elektrondenzní disk,

ep – elektrondenční destička, fl- bičík, hr – hlavička, lr – laterální lem bičíku, mi – mitochondrie, mp – střední oddíl, nu – jádro, pc –proximální centriola, pm – plazmatická membrána, tr –bičík; 1 – mikrofilamenta spojující boční stranu proximální centrioly s jádrem, 2 – mikrofilamenta spojující přední stranu proximální centrioly s jádrem, 3 – mikrofilamenta spojující boční stranu proximální centrioly s přední stranou distální centrioly, 4 – mikrofilamenta spojující elektrondenční kruh dvou centriol, 5 – mikrofilamenty spojující boční stranu distální centrioly s jádrem, 6 – mikrofilamenty spojující boční stranu proximální centrioly přes elektrondenční destičku s jádrem, 7 – mikrofilamenty táhnoucí se centrálně od distální centrioly k cytoplasmatické membráně. (Podle Alaviho et al., 2008)

2.1.1.6. Rozdíly ve stavbě spermíí dle způsobu oplození

U ryb rozeznáváme dva způsoby oplození, a to oplození vnější (například *Cyprinidae*, *Chondrostei*, *Cladistia*) a vnitřní (např.: *Cottidae*, *Embiotocidae*, *Poeciliidae*), dle reprodukčních charakteristik vlastních dané skupině (Alavi et al., 2008).

Samčí pohlavní buňky ryb s vnějším oplozením mají jednodušší organizaci a bývají označovány termínem aquasperm, což je termín používaný obvykle pro spermie ryb s vnějším oplozením, které se aktivují po styku s vnějším prostředím (voda, aktivační roztok); tyto spermie nemají akrozom a doba pohybu je u nich krátká (Alavi et al., 2008). Jádro je u nich vejčité nebo sférické s maximálně 5 μm délkou (Alavi et al., 2008), rozměry hlavičky se pohybují mezi 2 – 2,4 μm u jezerní formy pstruha obecného (*Salmo trutta m. lacustris*) po 8 – 11 μm u úhoře říčního (*Anguilla anguilla*) (Linhart et al., 1991). Střední část u těchto spermíí měří cca 2 – 4 μm , nachází se zde pouze několik mitochondrií. Bičík je dlouhý 30 - 40 μm , přičemž se mohou vyskytovat i dva u jedné spermie (Alavi et al., 2008).

Skupiny s vnitřním oplozením mají protáhlé jádro, relativně velký střední oddíl s vysokým počtem mitochondrií. Hlavička měří cca 10 μm , střední část cca 5 μm , bičík okolo 30- 40 μm . V případě některých skupin, například u *Goodeidae* (př.: *Sebasticus marmoratus*) vykazují spermie podobné charakteristiky jako u ryb s vnějším oplozením (Alavi et al., 2008).

2.1.7. Semenná plazma

Semenná plazma je roztok se složením podporujícím spermie a s významnou fyziologicko-endokrinní rolí po uvolnění spermií z testes do pohlavních cest a do vodního prostředí (Alavi, 2009).

Složení semenné plazmy je vnitro i mezi druhově rozdílné a závisí například na kontaminaci močí, zpětné resorpci nevytřených spermií a následných degenerativních změnách testes či na endokrinních vlivech a potravě adultních ryb (Alavi, 2009).

Osmolalita semenné plazmy složené z iontů, enzymů a zplodin energetického metabolismu spermií je u lososovitých cca 300 mOsm.kg⁻¹, u kapra obecného (*Cyprinus carpio*) je 286 mOsm.kg⁻¹ (Alavi a Cosson, 2006), u jeseterovitých je osmolalita nižší; u jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) naměřil Alavi (2009) hodnotu 51 mOsm.kg⁻¹. Z organických látek obsahuje plazma sacharidy, proteiny a lipidy, z iontů jsou u ryb vnějším oplozením nejpočetnější a nevýznamnější kationty K⁺ (ve velkém množství se vyskytují u lososovitých (Morisawa, 2008)), dále pak Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ a Cl⁻ (Linhart et al., 1991).

Obsah iontů v semenné plasmě je důležitý pro počáteční pohyblivost spermií. Vysoký obsah K⁺ motilitu gamet některých druhů inhibuje. Opačný efekt mají ionty Na⁺, Ca²⁺ a Mg²⁺ (Linhart et al., 1991).

V semenné plasmě se spermie obvykle nepohybují (Linhart et al., 1991).

2.2. Pohyb spermií

2.2.1. Aktivace pohybu

2.2.1.1. Faktory aktivující pohyb

Spermie ryb s vnějším oplozením jsou v pohlavním traktu mlíčáků nepohyblivé. Pohyb je aktivován při přechodu spermií do prostředí – vody, aktivačního roztoku při umělém výtěru (Alavi et al., 2008).

Významný vliv na aktivaci pohybu má v případě spermií s vnějším oplozením koncentrace iontů v prostředí (osmolalita). Aktivaci pohybu spermií mořských druhů ryb ovlivňuje hyperosmolalita slané vody, u sladkovodních druhů se uplatňuje naopak hypoosmolalita (Alavi et al., 2008), která indukuje otevření Ca²⁺ kanálů (Morisawa, 2008). U kaprovitých ryb jsou spermie v izotonickém roztoku vůči semenné plasmě nehybné. K aktivaci dochází v hypotonickém médiu (Morisawa, 2008).

U lososovitých ryb vyvolává pokles K^+ kaskádu signálů, které způsobují aktivaci spermií díky působení Ca^{2+} popřípadě díky signálům závislým na cAMP (Alavi et al., 2011). Spermie v testes lososovitých zůstávají nepohyblivé, pohybují se pouze v médiu prostém draselných kationtů, a to po inkubaci testikulárního spermatu v roztoku s vysokým pH obsahujícím hydrogenuhličitanové aniony (HCO_3^-) (Alavi et al., 2008).

U mořských druhů, jako je například platýs největší (*Scophthalmus maximus*) či ryba *Micropogonias undulatus* se spermie v roztoku s osmolalitou okolo 300 mOsm.kg^{-1} , který je vůči semenné plasmě izotonický, také nepohybují. Pohyb vyvolává hyperosmolalita aktivačního média (Morisawa, 2008). V případě dalších druhů, například u kambaly, se při aktivaci spermií uplatňuje rychlá redukce obsahu CO_2 v buňce. Této skutečností lze využít při použití aktivačních či imobilizačních roztoků (Alavi et al., 2008).

Pohyb spermií může vyvolat i roztok s obsahem neiontových látek (př. manitol) či proteiny z ovariální tekutiny (sleď). Do aktivace pohybu se zapojuje ještě řada dalších signálních molekul a cytoskeletálních komponentů (př.: dyneinová ramena). Lze tedy říci, že iniciace pohybu zahrnuje odpověď na změny iontových koncentrací a extracelulárních ligandů, které vedou k vnitrobuněčné odpovědi a následnému vyvolání pohybu (Alavi et al., 2008, Morisawa, 2008).

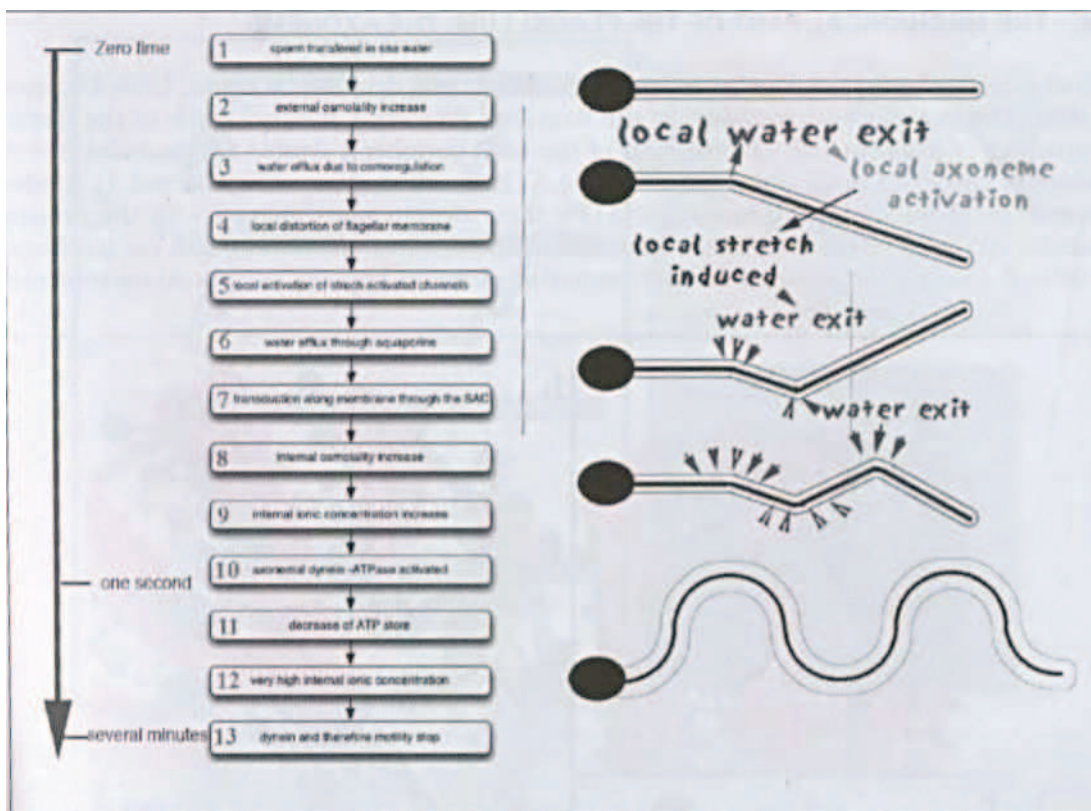
U ryb s vnitřním oplozením (př.: *Poeciliidae*) je aktivace spermií podobnější procesu zrání a aktivace spermií u savců, což znamená, že v testes se spermie nepohybují a k jejich aktivaci dochází při průchodu pohlavními cestami (Alavi et al., 2008).

Draselné kationty mají negativní vliv na pohyblivost spermií u ryb s vnitřním i vnějším oplozením (Linhart et al., 1991). Pokud se spermie nachází v prostředí s jejich vyšší koncentrací a zároveň s nižším pH, je nepohyblivá. Tento efekt lze zvrátit přidáním iontů Ca^{2+} . (Linhart et al., 1991, Morisawa, 2008).

Antagonismus vápníku a draslíku zkoumal například Linhart et al. (2002) u veslonosa amerického (*Polyodon spathula*), kdy byly spermie vystaveny různým koncentracím draselných a vápenatých iontů. Přítomnost KCl nebo K^+ v množství $5-15 \text{ mmol.l}^{-1}$ byla využita k inhibici či zastavení pohybu. Schopnost pohybu se obnovila přidáním malého množství $CaCl_2$ do roztoku reaktivačního média (Linhart et al., 2002).

Dále se v případě ryb s vnitřním oplozením uplatňuje i enzym adenylátcykláza, jehož aktivace je u savčích spermii ovlivněna extracelulárními HCO_3^- ionty. Podobný vliv je zaznamenán i u lososovitých ryb. V případě platýse pak HCO_3^- motilitu spermie inhibuje (působení prostřednictvím enzymu karbanhydrázy) (Alavi et al., 2008).

Motilita může být regulována i steroidními substancemi, např.: u savců sulfátovým steroidem SAAF, progesteronem, přílivem kationů vápníku (Ca^{2+}) a čichovými faktory (Alavi et al., 2008).



Obr.4.: Schéma aktivace pohybu spermie (Podle Alaviho et al., 2008)

2.2.1.2. Hyperpolarizace membrány a produkce cAMP

Hyperpolarizace je proces změny polarity membrány spouštěný signály vnějšího prostředí přes iontové kanály. Důsledkem jsou změny na molekulární úrovni (Alavi et al., 2008).

U lososovitých ryb vyvolá pokles mimobuněčných K^+ jejich únik z buňky, a tím i hyperpolarizaci membrány, vzestup obsahu kationů vápníku v buňce a syntézu cAMP. Motilitu může inhibovat tetraethylmoniak a blokace kanálů závislých na napětí K^+ iontů, což naznačuje, že tyto kanály mají vliv na motilitu, neboť jsou inhibitory

cAMP. Vzestup iontů Ca^{2+} svědčí o jejich zapojení do aktivačního procesu, protože některé inhibitory jsou naopak vázány na kanály propouštějící vápník. Tímto způsobem se Ca^{2+} podílí na hyperpolarizaci a produkci cAMP (Alavi et al., 2008).

Výše popsané procesy se uplatňují zejména u sladkovodních ryb s vnějším oplozením. Například u sledě však vstupují do hry proteiny ovariální tekutiny. Po obalení proteinem SMIF dochází u této ryby k hyperpolarizaci membrány, poté k výměně iontů Ca^{2+} a Na^+ , čímž dochází k zahájení vtoku Ca^{2+} (Alavi et al., 2008).

2.2.1.3. Aktivace axonemálního pohybu

Struktura axonemy je po spermiogenezi kompletní. Na motilitu mají vliv zejména zde probíhající fosforylace a defosforylace proteinů (Alavi et al., 2008).

U ryb mají regulační podjednotky cAMP-dependentní proteinkinázy testikulárně specifickou strukturu. U lososovitých má specifická proteinkináza nízkou molekulární hmotnost a krátkou N- sekvenci na konci, která umožňuje pevné připojení k mikrotubulům.

Aktivovaná proteinkináza umožňuje v průběhu pohybu fosforylaci ve vnějších dyneinových ramenech. Jako regulátory fosforylace byly identifikovány proteazomy, obsahující klíčové enzymy schopné inhibovat proteinkinázu v axonemě, které jsou lokalizovány na výběžku cytoplasmatické membrány na bázi vnějších dyneinových ramen. Proteinfosfatázy katalyzují defosforylaci proteinů. Ve spermiích lososovitých byly nalezeny 3 Ser/Thr proteinfosfatázy (Alavi et al., 2008).

K vyvolání pohybu spermií kostnatých ryb, například kapra, čtverzubců a danií není nezbytná přítomnost cAMP. U jejich spermií vystavených hypoosmotickému prostředí dochází k hyperpolarizaci membrány vedoucí k výměně iontů. Následný tok Ca^{2+} může indukovat motilitu. U čtverzubců dochází díky zvýšení koncentrace vnitrobuněčného K^+ k pohybu, u danií ho vyvolává snížení obsahu K^+ v buňce. Dalším iontovým regulátorem je HCO_3^- umožňující inhibiční efekty (Alavi et al., 2008).

2.2.2. Obecné charakteristiky pohybu spermií

2.2.2.1 Typy pohybu, vliv struktury spermie

U spermií ryb rozlišujeme tři typy pohybu, a to lineární, nelineární a kruhový. Dominantním typem pohybu je lineární. Typ nelineární a kruhový se objevují při nízkých pohybových frekvencích. Způsob pohybu je pak určován symetrií vlnění

bičíku, kterou ovlivňuje koncentrace iontů v prostředí, není nijak ovlivněný strukturou (Alavi et al., 2008).

Pohyb je parametr, který může být ovlivněn i strukturou buňky, například tvarem hlavičky, který může mít vliv na hydrodynamiku. Na rychlosti plavání se může projevit počet mitochondrií. Boční lem bičíku může pro změnu ovlivnit sílu úderů bičíku (Alavi et al., 2008).

2.2.2.2. Doba pohybu, frekvence

Doba, po kterou jsou spermie ryb schopny pohybu, je krátká. Od třiceti sekund u značné části sladkovodních kostnatých ryb, přes 60-90 vteřin u kapra obecného a pstruha duhového, až po několik minut u mořských ryb (čeled' *Labridae* až 15 minut) (Alavi et al., 2008), např.: veslonos americký (*Polyodon spathula*) až 9 minut (Linhart et al., 2002).

Frekvence pohybu bičíku je v prvních okamžicích vysoká (více než 100 Hz). Značná je i počáteční rychlost, okolo ($300 \mu\text{m}\cdot\text{sec}^{-1}$), přičemž vyšší je u ryb sladkovodních. Frekvence i rychlost pohybu později klesají (Alavi et al., 2008, Linhart et al., 2002).

Bezprostředně po aktivaci je rychlost pohybu spermií největší. Během této časné periody mají spermie jeseterů a veslonosů rychlost $175\text{-}250 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Cosson et al., 2000 in Linhart et al., 2002). Ve třech až šesti minutách od aktivace klesá tato rychlost na $50\text{-}100 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Linhart et al., 2002).

3. Cytoplasmatická membrána

3.1. Stavba cytoplasmatické membrány

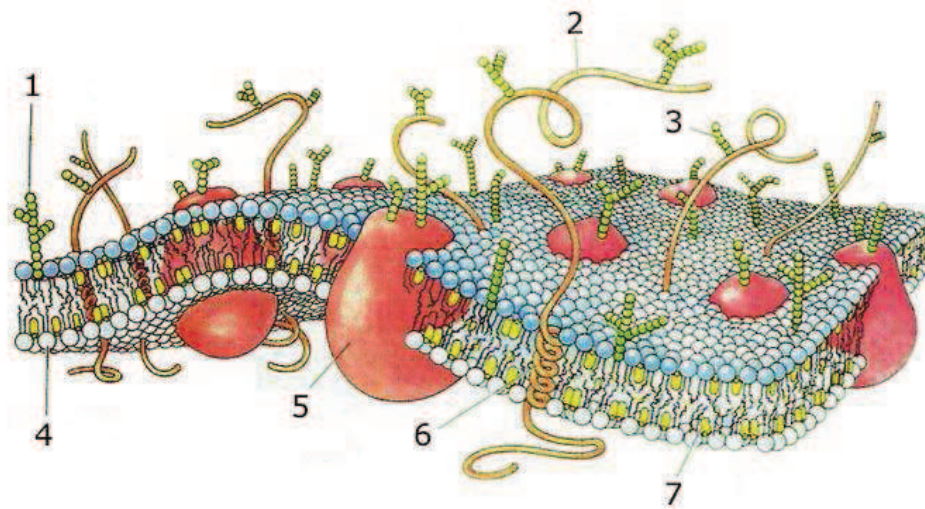
Cytoplasmatická membrána tvoří fázové rozhraní mezi vnitřním prostředím buňky a jejím okolím. Plní řadu důležitých funkcí. Umožňuje a řídí transport látek mezi buňkou a okolím, přijímá informace z vnějšího prostředí a od okolních buněk, slouží k vzájemnému rozpoznání a komunikaci buněk (Závodská, 2001).

Membrána je silná 5-8 nm, což je zhruba desetitisícina tloušťky listu v knize. Její základ tvoří lipidová dvojvrstva složená z molekul jedním hydrofilním a jedním či dvěma hydrofobními konci. Takové molekuly s hydrofilními i hydrofobními částmi jsou označovány jako amfipatické (Alberts et al., 1997). Dvojvrstva je uspořádána tak, že hydrofilní konce, které tvoří polární části molekul, jsou v kontaktu s vodním

prostředím, zatímco nepolární části molekul směřují dovnitř membrány; tvoří tak hydrofobní rozhraní oddělující dva různé vodné roztoky (Vodrážka, 2002).

Lipidová dvouvrstva dokonale splňuje požadavky kladené na membrány. Je nepropustná pro ionty i pro většinu polárních molekul, z nichž jí nejspíše prochází malá molekula vody; je kapalná, tudíž může sloužit jako rozpouštědlo membránových proteinů a může zacelit otvor vniklý v membráně (Vodrážka 2002). Tato struktura se označuje též termínem tekutý krystal či fluidní mozaika (Závodská, 2001).

Naprostá většina membránových lipidů patří mezi fosfolipidy (fosfatidylcholinu, fosfatidylethanolaninu, fosfatidylserinu, fosfatidylinositolu, difosfatidylglycerolu). Další skupinou membránových lipidů jsou sfingomyeliny, jejichž základem je sfingosin, mezi jehož deriváty patří mimo jiné cerebrosidy a glykolipidy, také obsažené v membránách (Vodrážka, 2002).



Obr.5.: Trojrozměrné schéma cytoplasmatické membrány: 1. glykolipid, 2. alfa-helix protein, 3. oligosacharidový boční řetězec, 4. fosfolipid, 5. globulární protein, 6. hydrofobní část alfa-helix proteinu, 7. cholesterol (Podle webu²)

Molekuly fosfolipidů drží pohromadě díky hydrofobním interakcím, silám slabším než kovalentní vazby, proto se většina molekul lipidů a některé membránové proteiny mohou pohybovat do strany v rovině vrstvy. Pohyb mezi vrstvami – tzv. flip-flop neboli pohyb mezi vrstvami je vzácný (Campbell a Reece, 2008).

Další nezbytnou součástí cytoplasmatické membrány jsou proteiny. Na rozdíl od lipidů, které tvoří stavební skelet a vhodné prostředí pro molekuly bílkovin,

jsou proteiny nositeli většiny funkcí. Zastoupení lipidových a proteinových složek je proměnlivé, u různých membrán se jejich hmotnostní podíl pohybuje v rozmezí 0,4-4 (Vodrážka, 2002).

Ve srovnání s běžnými molekulami proteinů mají membránové bílkoviny odlišné rozložení hydrofilních a hydrofobních zbytků, protože prochází dvěma různými typy prostředí (viz Obr. 5). Polypeptidový řetězec obvykle prochází lipidovou dvouvrstvou jako α -helix, avšak v případě složitých proteinů, které procházejí membránou několikrát, nacházíme i strukturu β -skládaný list (Alberts et al., 1997).

Membránové proteiny rozdělujeme na integrální (vnitřní) a periferní. Helikální strukturu mívají bílkoviny integrální, naproti tomu složité molekuly tvořící vodní póry mohou mít ve svých řetězcích obě zmiňované struktury. Mnoho membránových proteinů prochází vrstvou napříč, na každé straně vrstvy z nich část vyčnívá; tyto proteiny mají podobně jako sousední lipidy hydrofilní a hydrofobní úseky. Jiné proteiny se nacházejí úplně mimo buňku, ke které se připojují pouze jednou či několika kovalentními vazbami. Další proteiny jsou pro změnu s membránou svázané pouze interakcemi s jiným membránovými proteiny či z cytosolové strany nepolární mastnou kyselinou nebo izoprenoidem zanořeným do vnitřní strany membrány (Vodrážka, 2002, Alberts et al., 1997).

Význam integrálních membránových proteinů spočívá především v umožnění komunikace s okolím. Tato komunikace může být:

- látková, kdy proteiny fungují jako úzce specifické přenašeče mezi oběma prostory oddělenými cytoplasmatickou membránou,
- mechanická, kdy jsou molekuly navázány na buněčnou kostru nebo na analogické proteiny sousedních buněk nebo na mezibuněčnou hmotu,
- signální, pokud se membránové proteiny účastní přenosu signálu, který spočívá ve splynutí receptoru na vnější straně membrány s ligandem (př.: neurotransmitter, hormon, protilátka v membráně lymfocytu). Vazba s ligandem ovlivní prostorovou strukturu receptoru a tím i přenos signálu přes membránu (Alberts et al., 1997, Campbell a Reece, 2008).

Povrchové membránové proteiny jsou zpravidla menší molekuly zprostředkovávající rychlý funkční kontakt mezi vzdálenějšími, většími a méně pohyblivými membránovými proteiny (Rozsypal et al., 2003).

3.2. Přenos látek přes membránu

Výměna látek mezi buňkou a prostředím je z velké části závislá na vlastnostech cytoplasmatické membrány. Existují v zásadě dva způsoby, jak mohou látky přes membránu proniknout, a to specifický a nespecifický průnik (Rozsypal et al., 2003).

Nespecifický průnik znamená, že látky mohou volně procházet lipidovou dvojvrstvou dle svých fyzikálních vlastností. Membrána propouští především molekuly nepolárních látek, například O_2 a CO_2 , ale i některé málo polární organické látky, jako jsou ethanol a mastné kyseliny. Naproti tomu při specifickém průniku je nutná přítomnost proteinového přenašeče (Rozsypal et al., 2003).

Proteinové přenašeče jsou nutné k přenosu téměř všech malých organických molekul přes membrány. Výjimkou jsou molekuly rozpustné v tucích a malé molekuly bez náboje, které mohou procházet přes membránu prostou difuzí. Přenašečové proteiny jsou typické svou vysokou selektivitou, často přenášejí pouze jeden typ molekuly (Alberts et al., 1997).

Důležitou otázkou transportních procesů je, co pohání transport látek mezi buňkou a prostředím. Významnou roli v této oblasti zastává koncentrace látek. Putují-li látky po směru koncentračního spádu, čili z míst s větší koncentrací do míst s koncentrací nižší, jedná se o pasivní transport. V případě přenosu látek proti koncentračnímu gradientu se jedná o transport aktivní. K aktivnímu transportu je nutná energie, kterou přenašečové proteiny získávají z různých zdrojů (Alberts et al., 1997).

Základním typem pasivního transportu je prostá difúze, kdy látky putují po svém koncentračním spádu. Látky putují z místa s vyšší koncentrací do místa s koncentrací nižší až do jejich vyrovnání. Jedná se o spontánní děj, u kterého není zapotřebí žádná práce. Příkladem je příjem kyslíku buňkou provádějící buněčné dýchání (Campbell a Reece, 2008).

U elektricky nabitých molekul se uplatňuje další síla, gradient elektrochemického potenciálu. Ten určuje směr, kterým se budou látky přenášet. Principem tohoto způsobu přenosu je skutečnost, že většina membrán je elektricky nabitá. Rozdíl u těchto nábojů se nazývá membránový potenciál, který působí na molekuly v blízkosti buňky. Tímto způsobem difunduje například Na^+ , jehož koncentrace vně buňky je větší než uvnitř (Alberts et al., 1997).

Usnadněná difúze je druh transportu, který k přenosu polárních molekul a iontů využívá transportních proteinů membrány. Speciálním způsobem pasivního transportu je osmóza. Její směr určuje rozdíl celkové látkové koncentrace. Voda se pohybuje

z roztoku hypotonického do hypertonického dokonce i tehdy, má-li hypotonický roztok více látek (Campbell a Reece, 2008).

Způsob přenosu proti koncentračnímu gradientu látky se nazývá aktivní. Jedná se o transport „do kopce“, tudíž potřebuje energii, kterou buňka obvykle získává činností vlastního metabolismu (Campbell a Reece, 2008).

Práci při aktivním transportu vykonávají specifické proteiny; energii pro většinu aktivního transportu zajišťuje ATP. Membránové proteiny přispívají k tvorbě membránového potenciálu. Příkladem takového systému je sodnodraselná pumpa, která přenáší v každém cyklu jeden kladný náboj, nebo protonová pumpa aktivně přenášející vodíkové kationy ven z buňky (Campbell a Reece, 2008).

Aktivní transport zajišťují buňky třemi různými hlavními cestami. Za prvé se jedná o spřažené přenašeče spojující přenos jednoho solutu přes membránu směrem „z kopce“ a druhého směrem „do kopce“. Druhým způsobem jsou pumpy poháněné ATP spřahující transport „do kopce“ s hydrolýzou ATP a třetí jsou pumpy poháněné světlem, které se nacházejí v buňkách halobakterií a spřahují transport „do kopce“ s přívodem světelné energie (Alberts et al., 1997).

Přenašečové proteiny mohou spojovat přenos jednoho anorganického iontu s pohybem jiného iontu. Pokud přenášejí oba ionty stejným směrem, jedná se o symport, přenos dvou látek různými směry se nazývá antiport. Přenašečový protein transportující pouze jednu látku zajišťuje uniport (Alberts et al., 1997).

Voda a malé molekuly vstupují do buňky difúzí přes cytoplazmatickou membránu či prostřednictvím transportních proteinů. Velké molekuly typu polypeptidů a polysacharidů přechází přes membránu za pomoci mechanismů, na kterých se podílí měchýřky, vezikuly (Alberts et al., 1997).

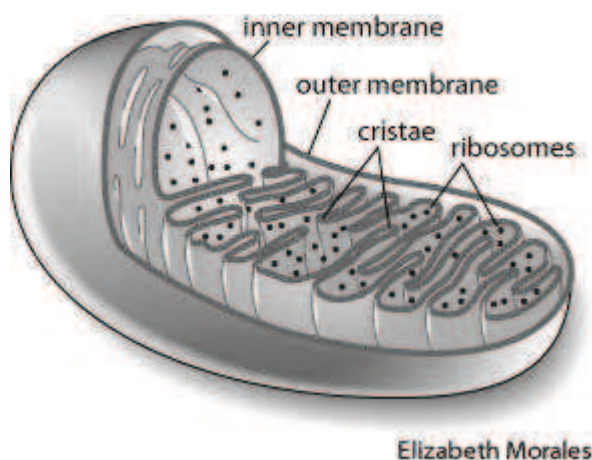
O exocytózu se jedná v případě, pokud buňka molekuly ve váčcích vylučuje, prostřednictvím endocytózy je naopak přijímá. Endocytózy existují tři typy: fagocytóza, při níž buňka pomocí pseudopodií pohlcuje částici ve svém okolí, pinocytóza, při které přijímá extracelulární tekutiny, posledním typem je receptory zprostředkovaná endocytóza, která je výrazně specifická. Umožňují ji bílkoviny s receptorovými místy ukotvené v membráně (Campbell a Reece, 2008).

4. Mitochondrie

Mitochondrie patří, podobně jako chloroplast u rostlin, mezi semiautonorní organely buňky a mají nezastupitelnou roli v získávání energie pro život buňky. Jejich počet odpovídá energetické úrovni buňky (Závodská, 2001).

Jsou obklopeny dvěma membránami, odvozenými od plasmatické membrány. Vnější je hladká, vnitřní zvrásněná do záhybů zvaných kristy, vnitřní dělí prostor mitochondrie na dva oddělené kompartmenty, na mezimembránový prostor a mitochondriální matrix obklopenou vnitřní membránou. Matrix obsahuje mnoho různých enzymů, mitochondriální DNA a ribosomy. Kristy zvětšují povrch vnitřní membrány, do které jsou zabudovány proteiny uplatňující se při buněčné respiraci, včetně enzymu vytvářejícího ATP (ATP-syntáza), čímž je zvýšena efektivita buněčného dýchání (Campbell a Reece, 2008).

V buňce jsou mitochondrie přítomny ve velkém množství a ve spojení s vlákny cytoskeletu mohou vytvářet pohybující se řetězce. Jindy naopak zůstávají na jednom místě buňky, a dodávají tak energii do místa největší potřeby. Ve spermích jsou těsně ovinuty kolem hnacího bičíku (Alberts et al., 1997).



Obr.6.: Stavba mitochondrie (Podle webu³)

4.1. ATP

Adenosintrifosfát (ATP) je důležitý nukleotid (resp. nukleosidtrifosfát), který se skládá z adenosinu a trojice fosfátů navázané na 5' uhlíku. Je zcela zásadní pro funkci všech známých buněk. Jeho význam spočívá v tom, že při rozkladu ATP na ADP (neboli adenosindifosfát) a fosfát dochází k uvolnění značného množství energie. Tato energie se využívá téměř ve všech typech buněčných pochodů,

jako je například vnitrobuněčný a membránový transport, syntéza proteinů či syntéza RNA (Vodrážka, 2002).

4.1.1. Oxidativní fosforylace, mechanismus vzniku ATP

Většina buněčného ATP se vytváří v mitochondriích v průběhu citrátového cyklu. Během tohoto cyklu mitochondrie zpracovávají acetylové skupiny, přičemž produkují NADH – aktivované molekuly nesoucí elektrony s vysokou energií a CO₂ jako vedlejší produkt. NADH předává své molekuly do elektrontransportního řetězce v mitochondriální membráně a přechází do oxidovaného stavu NAD⁺ (Alberts et al., 1997).

Elektrony jsou předávány v řetězci k molekulárnímu kyslíku za vzniku vody. Energie uvolněná při průchodu elektronů elektrontransportním řetězcem se využívá k čerpání protonů. Protonový gradient pak pohání syntézu ATP, čímž doplňuje chemiosmotický mechanismus. Tento děj zahrnuje jak spotřebu kyslíku, tak připojení fosforylové skupiny k ATP, proto se nazývá oxidativní fosforylace (Alberts et al., 1997).

5. Demembrance spermií

5.1. Co je demembrance

Demembrance spermií, respektive somatických buněk, je proces, při němž dochází působením chemických látek k odstranění cytoplasmatické membrány, a tím i k usnadnění výměny látek mezi buňkou a prostředím. Docílíme jí aplikací šetrného neiontového detergentu (př.: TritonX-100). Aktivace pohybu spermií je pak znovu spuštěna přidáním např.: ATP-Mg²⁺ (Linhart et al., 2002).

Bičík demembranované spermie je vystavený působení látek z vnějšího prostředí (voda, aktivační roztok). Přenos iontů není nijak usměrněn. Vliv látek na motilitu spermie tak může být testován přímo (Linhart et al., 2002, Ashizawa et al., 1998).

Pohybový aparát spermie zůstává při demembranci neporušen. Ashizawa et al. (1998) používají ve své práci kromě zmíněného detergentu ještě látku Nonidet-40 (neiontový detergent, který zabraňuje nespecifickým hydrofobním reakcím).

5.2. Demembranační média

5.2.1. Demembranační média

Základem demembranačního média je směs detergentu, obvykle bývá používán TritonX-100, a další komponenty iontové či neiontové povahy. Ve směsi jsou použity

pufry, například Tris-HCl s pH 8,2. Další látky přítomné ve většině demembranačních roztoků jsou EDTA, EGTA, DTT a ionty draslíku, sodíku či neiontové sloučeniny (glukóza, ATP, Mg-ATP) (Linhart et al., 2002, Cosson et al., 1995).

Linhart et al. (2002) používá při svém pokusu demembranační roztok následujícího složení: 20 mmol.l⁻¹ NaCl, 0,5 mmol.l⁻¹ EDTA (Sigma), 1 mmol.l⁻¹ dithiothreitolu (DTT, Sigma D-0632), 20 mmol.l⁻¹ Tris, pH 8,2, 0,04 % TritonX-100 – při 0°C.

Cosson et al. (1995) používá následující roztok: 0,15M K acetát, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM Tris pH 8,2, 0,04% Triton-X 100; po 30 s při 0°C je 1 µl poměrné části smíchán při pokojové teplotě s RM (0,15M K acetát, 1mM DTT, 20 mM Tris pH 8,2, 1 mM MgCl₂, 1 mM ATP (bez vanadičnanu, Boehringer; standardní roztok, neutrální pH), 1 mM EGTA a cAMP).

Redondo et al. (1991) používá roztok ve složení 0,15 M K⁺ acetát, 0,5 mM CaCl₂, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM Tris-HCl (pH 8,2), 0,4% TritonX-100.

5.2.2. Reaktivační média

Nepohyblivé spermie jsou po demembranaci smíchány s roztokem látek, který má obnovit či zahájit motilitu spermií. Základní komponenty jsou ATP, DTT, Tris-HCl (pH 8,2), EDTA, EGTA, tedy obdobné jako u demembranačního média (Linhart et al., 2002).

Linhart et al. (2002) ve své práci uvádí následující složení reaktivačního média 20 mmol.l⁻¹ NaCl, 1mmol.l⁻¹ DTT, 20 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pH 8,2, 1 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 2 mg BSA, 1 mmol.l⁻¹ ATP, bez vanadičnanu. BSA je nezbytný kvůli tomu, aby se zabránilo přilnutí spermií k podložnímu sklíčku.

U Cossona et al. (1995) je reaktivační médium složeno z těchto komponentů: 0,15M K acetát, 1mM DTT, 20 mM Tris pH 8,2, 1 mM MgCl₂, 1 mM ATP (bez vanadičnanu, Boehringer; standardní roztok, neutrální (pH 7)), 1 mM EGTA a cAMP (je-li přidáván).

Redondo et al., (1991) používá roztok o složení 0,15 mM K⁺ acetát, 1mM DTT, 0,1 mM EGTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,2), 1 mM Mg-ATP.

V některých studiích mohou být reaktivační a demembranační krok spojené a provedené v jednom roztoku. V případě metody jednoho kroku dodáváme ATP přímo na spermie, které chceme reaktivovat. V případě použití dvou odlišných roztoků dodáváme spermie do roztoku s obsahem ATP (Ashizawa et al., 1998).

5. 3. Příklady použití demembrance

5.3.1. Zkoumání vlivu iontů na pohyblivost spermií

Pohyb spermií ryb spouští mimo jiné změna osmotických podmínek při přechodu z těla ryby do vnějšího prostředí (Alavi et al., 2008).

U veslonosa amerického (*Polyodon spathula*) byl zkoumán inhibiční vliv nízkých koncentrací KCl, MgCl₂, NaCl, CaCl₂ v aktivačním roztoku (20 mmol Tris-HCl s pH 8,2, a BSA). Linhart et al. (2002) zkoumal inhibiční efekt K⁺ přítomného v reaktivačním médiu na axonemu.

Přítomnost KCl nebo K⁺ v koncentraci 5-15 mmol.l⁻¹ inhibovala demembranovaný bičík. Přidání 20 mmol.l⁻¹ NaCl umožnilo reaktivaci všech spermií po dodání 50-200 μmol cAMP⁻¹. Efekt iontů na motilitu byl větší v případě, že byly spermie demembranovány a reaktivovány v roztoku s obsahem 0,5 mmol CaCl₂l⁻¹ (Linhart et al., 2002).

V případě použití demembranačního média bez K⁺, ale s koncentrací CaCl₂ vyšší než 100 μmol l⁻¹ v reaktivačním médiu, byl pohyb bičíku reaktivované spermie šubavý s malou amplitudou, velká amplituda byla vyvolána v médiu s obsahem CaCl₂ vyšším než 250 μmol l⁻¹; tyto závěry potvrzovaly funkční sensitivitu axonemů veslonosích spermií ke kationtu vápníku (Linhart et al., 2002).

Redondo et al. (1991) prováděl experimenty se spermatem kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Ve své studii zkoumali vliv iontů na pohyb nativních a demembranovaných spermií.

Poměr pohyblivých spermií v průběhu pokusu periodicky klesal. Při inkubaci v médiu s obsahem 200 mM KCl bylo pohybu schopno pouze 1% nativních spermií. Ztráta pohybového potenciálu nastala v semenné plasmě a byla reversibilní po inkubaci v médiu s 200 mM KCl (Redondo et al., 1991).

Spermie byly úspěšně reaktivovány po rozpuštění membrány v TritonuX-100. Na ATP –Mg²⁺ závislá reaktivace nastala, i když nedošlo k přidání cAMP do reaktivačního média (Redondo et al., 1991).

Ve studii Pouparda et al. (1997) byly demembranované spermie přidány do reaktivačního roztoku s nízkou koncentrací glukózy (0-0,05 mmol.l⁻¹) s osmolalitou 60-140 mOsm.kg⁻¹, v médiu bez Na⁺ a K⁺ obsahujícím glukózu, byl axonemální pohyb zaznamenán pouze po přidání méně než 25 mmol.l⁻¹ KCl nebo NaCl (osmolalita cca 100 mOsm.kg⁻¹). Tyto parametry ukázaly, že nízké koncentrace iontů

nebyly axomenálnímu aparátu škodlivé, díky tomu mohl být funkční i za těchto podmínek.

Za přítomnosti KCl, NaCl nebo cholinchloridu v reaktivační médiu bylo 95 % reaktivovaných spermií schopno pohybu v médiu s osmolalitou 140-400 mOsm.kg⁻¹. Procento reaktivovaných spermií průběžně klesalo s vzestupující osmolalitou a při 600-650 mOsm.kg⁻¹ nebyl 30 sekund po ředění pozorován žádný axonemální pohyb. Při osmolalitě 480-550 mOsm.kg⁻¹ bylo 5 sekund po ředění pozorováno 80-90% hůře pohyblivých spermií; poté pohyblivost opět značně poklesla a o 45-60 sekund později nebyl pohyb zaznamenán vůbec (Poupard et al., 1997).

Williams a Ford (2001) zkoumali vliv Ca²⁺ na lidské spermie při pokojové teplotě nebo při 37°C v roztoku s 0,8% v/v TritonemX-100. CaCl₂ byl přidán do demembranačně-reaktivačního média k zvýšení aktivity Ca²⁺.

Motilita reaktivovaných spermií byla krátká a jejich rychlost střední dráhy spermií (VAP) vykazovala růst během první minuty po demembranaci a reaktivaci, poté klesala a na nízké úrovni se stabilizovala po 3 minutách (Williams a Ford, 2001).

Williams a Ford (2001) také pozorovali efekt Ca²⁺ na pohyblivost, rychlost střední dráhy spermií (VAP). Některé spermie byly pohyblivé ještě 25 minut po aktivaci. Pokles jejich motility nebyl zjištěn ani v případě dodání ATP±cAMP až ve třech minutách od demembranace. Procento pohyblivých spermií 0,5-1 min po demembranaci a reaktivaci bylo vysoké 75±6 % nebo 52±22%; vyšší bylo, pokud proces proběhl při 37° C (Williams a Ford, 2001).

Nebylo-li cAMP součástí demembranačně-reaktivačního média, nemělo efekt na zvýšení motility ani při předchozí inkubaci spermií s pentoxifylinem. Po přidání ATP a cAMP 10 sekund po demembranaci nebyl efekt na reaktivaci motility pozorován. Pohyblivé spermie byly zaznamenány v případě, že k přidání ATP±cAMP došlo ihned po demembranaci médiem s 0,01 nebo > 0,02% v/v TritonuX-100; množství 0,01 % TritonX-100 bylo příčinou nekompletní demembranace (Williams a Ford, 2001).

Množství Ca²⁺ v demembranačně-reaktivačním médiu na počátku bylo cca 20 nmol.l⁻¹. Zvýšení obsahu Ca²⁺ na 100 nmol.l⁻¹ nemělo signifikantní vliv na motilitu, ale při zvýšení na 500 nmol.l⁻¹ byly procento pohyblivých spermií a rychlost střední dráhy spermií (VAP) prokazatelně redukovány (Williams a Ford, 2001).

5.3.2. Zkoumání vlivu ATP a cAMP na pohyblivost spermií

Energetická spotřeba spermií je pokryta ATP. Cyklický adenosin monofosfát (cAMP) je derivátem ATP, který buňka používá v signálních drahách; obvykle slouží jako aktivátor proteinkináz, konkrétně proteinkinázy A (Alavi et al., 2008, Cosson et al., 1998).

Vliv ATP a cAMP na spermie pstruha duhového (*Onkorhynchus mykiss*) zkoumal Cosson et al. (1998). Spermie byly zkoumány za různých podmínek vzhledem k předchozí fázi pohybu *in vivo* a k předchozí koncentrací ATP.

Při pokusu bylo dáno 10 μ l s spermií do 200 μ l demembranačního média; ředění bylo použito 1:10 (spermie:demembranační médium). Za použití roztoků výše uvedeného složení došlo k okamžitému pohybu axonemy, který byl stabilní po dobu 5-12 minut dle podmínek pokusu. Zajímavostí je, že ATP není při vlastní demembranaci nezbytný (Cosson et al., 1998).

V případě, že koncentrace ATP byly vyšší než 25 μ M byly všechny spermie aktivní s frekvencí úderů bičičku 15-20 Hz, i když aktivovány před počátkem pokusu. Při této koncentraci byla v reaktivačním médiu nutná přítomnost cAMP, nikoli však v médiu demembranačním; jeho přidání nebylo závislé na předchozí motilitě spermií. Mezi působením ATP a cAMP panoval antagonismus. U spermií byla zřejmá afinita k cAMP jako mezičlátku aktivace pohybu (Cosson et al., 1998).

Spermie byly při nízkých koncentracích aktivovány 50 μ M ATP bez přídavku cAMP. Při koncentraci ATP 10 μ M bylo pohyblivých jen málo spermií, naproti tomu při 20-30 μ M ATP se pohybovalo 90-95% gamet, ale frekvence pohybu bičičku byla nízká (10-15 Hz). Po zvýšení koncentrace ATP nad 50 μ M zřetelně klesl počet pohyblivých spermií, při použití 1 mM ATP nebyla pohyblivost homogenní, 90-95% gamet bylo nepohyblivých; možností ke zvýšení aktivity bylo přidání cAMP (Cosson et al., 1998).

Myšlenku antagonismu ATP a cAMP podporoval i fakt, že byly-li nepohyblivé spermie přidány do aktivačního roztoku s 1 mM ATP bez cAMP, po přidání 50 μ M cAMP došlo k okamžitému nastartování motility (Cosson et al., 1998).

Cyklický adenosinmonofosfát mohl být přidán do demembranačního nebo reaktivačního média, nezbytný byl pouze v médiu reaktivačním. Byl-li pouze v tomto roztoku, procento pohyblivých bičičků se zvyšovalo postupně s rostoucí koncentrací z 5% při 0,1 cAMP po 100% v 10 μ M cAMP (Cosson et al., 1998).

5.3.3. Zkoumání vlivu teploty na demembranované spermie kura domácího

V případě spermií kura domácího je jedním z faktorů ovlivňujících aktivaci pohybu teplota. V roztoku prostém solí jsou spermie pohyblivé, až když je dosaženo teploty panující v ptačím těle (40-41 °C) (Ashizawa et al., 1998).

Jako neiontový detergent použili Ashizawa et al. (1998) TritonX-100 či Nonidet-40. Koncentrace detergentu v roztoku byla 0,1–0,2%. Následně bylo do roztoku přidáváno ATP, jehož optimální koncentrace pro reaktivaci spermií byla v tomto případě 0,05 and 0,5 mM.

Demembranační a reaktivační krok spojili autoři studie v jeden nebo, v případě použití konvenční metody demembranace, byly kroky provedeny každý zvlášť. V prvním případě se vliv zkoumaných látek projevil přímo v reaktivačním médiu, ve druhém případě bylo malé množství (cca 10 µl) demembranovaných spermií přidáno do reaktivačního média. Nevýhodou kohoutí spermie se ukázal fakt, že vlivem působení detergentů došlo ke zničení akrozomu; spermie kura jsou totiž na rozdíl od spermií kostnatých ryb opatřeny akrozomem. K odstranění tohoto problému byla použita centrifugace a metoda Percolového gradientu (Ashizawa et al., 1998).

Při teplotě 30 °C byla motilita spermií u obou použitých metod vysoká, nebyl mezi nimi zjištěn rozdíl. Při teplotách nad 40 °C byla motilita v případě jakékoli použité metody zanedbatelná. Demembranované spermie vykazovaly za použití metody Percolového gradientu při teplotě 30 °C vysokou pohyblivost, s výjimkou média, v němž bylo přítomno EGTA. Při 40 °C byla motilita spermií zanedbatelná. Obnovení pohyblivosti bylo dosaženo pouze za přítomnosti calyculinu A a kyseliny okadaikové, jakožto specifických inhibitorů proteinfosfatáz typu 1 (PP1) a typu 2 (PP2) nebo *p*-nitrofenyl fosfátu, které měly při 30 °C na pohyblivost spermií opačný vliv (Ashizawa et al., 1998).

3. Materiál a metodika

Pro účely mé bakalářské práce byly provedeny experimenty na spermiích kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a jesetera malého (*Acipenser ruthenus*).

3.1. Demembranace spermií kapra obecného (*Cyprinus carpio*)

3.1.1. Materiál

Sperma kapra, voda z kohoutku, demembranačně-reaktivační médium, ATP, pluronic; *Složení demembranačně-reaktivačního média*: 0,13 g NaCl, 0,0186 g KCl, 0,182 g Tris pH 8, 0,019 g EGTA, 0,1 g MgCl₂, 0,1 M TritonX-100, 0,02536 g ATP v 50 ml destilované vody.

3.1.2. Přístroje

V rámci experimentu bylo použito následujících přístrojů: barevné kamery Sony SSC 50 AP na mikroskopu BX-41 v konfiguraci pro pozorování v tmavém poli doplněné LED stroboskopickým osvětlením („exposurescope“), stroboskopické světlo bylo řízeno signálem z kamery, videosignál byl nahráván přístrojem Sony DVO 1000 MD doplněném o videotitulovač Hama s jednotkou vnitřního času Elvia.

Kromě výše uvedených přístrojů bylo použito běžné laboratorní nádobí (pipety, podložní sklíčka, zkumavky Ependorff, kádinky, laboratorní váhy atd.).

3.1.3. Metodika

Použití mlíčáci kapra obecného, pocházející z vlastního chovu fakulty rybářství a ochrany vod, byli 24 hodin před plánovaným pokusem hypofyzováni; dávka činila 1 mg hypofýzy na kilogram hmotnosti ryby; samci byli starší čtyř let, o hmotnosti vyšší než 2 kg. K dispozici bylo sperma od dvou samců – odebrané při teplotě 18° v den pokusu.

Odběr spermatu: Mlíčák byl fixován ve vlhké tkanině, aby se předešlo poranění při odběru. Samotný odběr byl prováděn pomocí injekční stříkačky, současně probíhala masáž dutiny břišní, aby došlo k uvolnění veškerého spermatu. Do provedení samotného experimentu bylo sperma uchováno v chladu

Pohyblivost spermií byla pozorována nejdříve v 50 μl destilované vody. Po smíchání smíchání destilované vodu s pluronicem (přidáván, aby se zabránilo adhezi

spermií k podložnímu sklíčku), byla směs kápnuta na sklíčko, následně bylo přidáno sperma.

Poté byla zjišťována pohyblivost spermií v demembranačně-reaktivačním médiu, jehož složení bylo popsáno výše. Dalším krokem bylo pozorování motility v demembranačně-reaktivačním médiu s TritonemX-100 bez ATP, poté s přidaným adenosintrifosfátem.

Obraz získaný pozorováním pod mikroskopem byl zaznamenáván pomocí výše uvedené videotechniky. Z videozáznamu na DVD byly jednotlivé snímky zachycované programem PowerDVD verze 4, použit byl každý druhý snímek (celkem 5). Uložené snímky byly následně složeny do jednoho v programu MicroImage 4.0 pomocí maker na analýzu obrazu, díky čemuž bylo dosaženo k vizualizace drah pohybu; nepohyblivé spermie byly zobrazeny bíle.

Dráhy pohybu byly následně změřeny v manuálním režimu programu MicroImage. Rychlost spermií byla vypočítána za použití naměřené dráhy a časového rozestupu snímků. Motilita spermií byla určena z poměru barevných, a tedy pohyblivých spermií ku nepohyblivým.

Doba pohybu spermií byla měřena stopkami s přesností na 1 s. Jako doba pohybu byl brán v úvahu čas, po který bylo možné zaznamenat v zorném poli alespoň jednu pohyblivou spermii.

Následně byla data zpracována v Excelu2003.

3.2. Demembranace spermií jesetera malého (*Acipenser ruthenus*)

3.2.1. Materiál

Sperma jesetera malého, destilovaná voda, demembranačně-reaktivační roztok, ATP, pluronic (proti adhezi spermií ke sklíčku); *Složení demembranačně-reaktivačního roztoku* (V= 10 ml): 0,117 g NaCl, 0,190 g EDTA, 1,211 Tris pH = 8,2, 0,203 MgCl₂.6H₂O, 7,7 ml destilované vody.

3.2.2. Přístroje

Přístroje použité při tomto pokusu byly tytéž jako v případě experimentu s kaprem.

3.2.3. Metodika

K dispozici bylo sperma mlíčáků jesetera malého, kteří byli předchozí den hypofyzováni v dávce 4 mg hypofýzy na jeden kilogram hmotnosti ryby; také tito samci pocházeli z chovu fakulty rybářství. Hmotnost ryb činila 1-1,2 kg při stáří větším než osm let. Teplota v době odběru spermií byla 15°C.

Odběr spermatu: Mlíčí bylo odebíráno v poloze břichem vzhůru, takže druhá osoba musela fixovat rybu za hlavu a ocas. Sperma bylo odebíráno za pomoci suché hadičky z měkkého plastu o průměru 5 mm o délce minimálně 20 cm, která byla na jedné straně šikmo seříznuta. Šikmý konec hadičky byl zasunut do urogenitální papily samce, volný konec do sběrné nádoby. Sperma poté volně vytékalo do nádoby. Do provedení experimentu bylo sperma uchováno v chladu.

Následný experiment byl obdobný jako u kapra obecného. Jediný rozdíl spočíval v přítomnosti či nepřítomnosti TritonuX-100 v demembranačně-reaktivačním médiu.

4. Výsledky

Výsledky experimentu s kaprem obecným jsou shrnuty v tabulkách 1. až 3.

Doby pohybu spermií ryb v testovacím médiu (destilovaná voda – dále uváděná pouze jako H₂O, DM-RM - demembranačně-reaktivační médium, DM-RM s ATP - demembranačně-reaktivační médium s ATP) jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 1.).

Tabulka 1.: Doba pohybu spermií kapra obecného (*Cyprinus carpio*)

Médium	H ₂ O	DM-RM	DM-RM + ATP
Doba pohybu	30 s	0	> 5 minut

Zjištěná doba pohybu spermií ve vodě je na dolní hranici doby pohybu u kaprovitých ryb, což pravděpodobně zapříčinila nízká kvalita testovaného spermatu. Dle předpokladu nebyla motilita v médiu bez ATP zaznamenaná, což bylo možno chápat jako důkaz proběhlé demembranace.

Doba pohybu spermií po přidání ATP se shoduje s předpokladem, že se demembranované spermie budou pohybovat déle v přítomnosti ATP, neboť tady již není zásoba buněčného ATP limitujícím faktorem pro motilitu, je přítomno v prostředí média, a proto je možné, aby trvání pohybu mnohonásobně překonalo fyziologické možnosti spermie. Z praktického hlediska zde jako limitační faktor působí vyschnutí kapky na podložním sklíčku.

Průměrné rychlosti v daném médiu v časech 15, 30 a 45 sekund (včetně směrodatné odchylky, variačního rozpětí a variačního koeficientu) jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 2.).

Tabulka 2.: Průměrné rychlosti pohybu spermií kapra obecného (*Cyprinus carpio*) v $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (hodnoty v rámci jednotlivých časů se stejným písmenem (číslicí) v indexu označení skupiny znázorňují skupiny, které se statisticky průkazně neliší ($\alpha=0,05$); pokud není písmeno (číslice) uvedeno, byla naměřena pouze jedna hodnota)

Rychlost v čase \ Médium	H ₂ O	DM-RM	DM-RM + ATP
15 s (sm. odch.; var. koef.; var. rozp.)	34,82 ^A (10,71; 0,31; 33,71)	0 (nebylo možno vypočítat)	51,68 ^{B,1,2} (27,37; 0,53; 84,33)
30 s (sm. odch.; var. koef.; var. rozp.)	40,02 ^A (15,97; 0,39; 52,24)	0 (nebylo možno vypočítat)	49,36 ^{A,1} (27,18; 0,55; 110,07)
45 s (sm. odch.; var. koef.; var. rozp.)	0 (nebylo možno vypočítat)	0 (nebylo možno vypočítat)	43,40 ² (27,57; 0,64; 77,32)

V demembranačně-reaktivačním médiu bez ATP jsou ve sledovaných časech spermie nepohyblivé. V demembranačně-reaktivačním médiu obsahujícím ATP je pohyb spermií zaznamenán, přičemž rychlosti zde zjištěné jsou prokazatelně rozdílné od rychlostí změřených ve vodném médiu. Z uvedených faktů vyplývá, že destilovaná voda není pro spermie příliš vhodným médiem, neboť neobsahuje žádné ionty.

Plné aktivace spermatu ihned po smísení s vodou nebylo dosaženo pravděpodobně kvůli nízké kvalitě používaného spermatu. Z tohoto důvodu je průměrná rychlost v čase $t = 30$ s vyšší než v $t = 15$ s. Porovnáním rychlostí demembranovaných spermií bylo zjištěno, že se průměrná hodnota v čase 30 s se prokazatelně odlišuje od průměrných hodnot v ostatních sledovaných časech.

Motilita (v % živých spermií) v daném testovacím médiu a čase (opět s uvedením směrodatné odchylky, variačního rozpětí a variačního koeficientu) je zachycena ve třetí tabulce (Tabulka 3.).

Tabulka 3.: Motilita spermií kapra obecného (*Cyprinus carpio*) (v % živých spermií)

Motilita v čase \ Médium	H ₂ O	DM-RM
15 s (sm. odch.; var. koef.; var. rozp.)	9,63 (4,52; 0,47; 7,83)	28,83 (36,36; 0,13; 51,42)
30 s (sm. odch.; var. koef.; var. rozp.)	6,49 (nebylo možno vypočítat)	32,64 (6,87; 0,21; 9,7)
45 s (sm. odch.; var. koef.; var. rozp.)	0 (nebylo možno vypočítat)	36,36 (nebylo možno vypočítat)

Úroveň motility v obou médiích je extrémně nízká, což je pravděpodobně způsobeno nízkou kvalitou používaného spermatu.

Výsledky experimentu na spermiích jesetera malého jsou uvedeny v tabulkách 4. – 6.

Doby pohybu spermií jesetera malého jsou zaznamenány v následující tabulce (Tabulka 4.).

Tabulka 4.: Doba pohybu spermií jesetera malého (*Acipenser ruthenus*)

Médium	H ₂ O	DM bez TritonuX-100 + ATP	3 : 1 DM-RM bez T. : DM-RM s T. + ATP
Doba pohybu	3 min	> 5 minut	> 5 minut

Doba pohybu spermií v destilované vodě mnohonásobně převyšuje dobu pohybu spermií u kapra obecného, avšak je zcela odpovídající pro jeseterovité ryby. V demembranačním médiu bez TritonuX-100 a ATP byla zjištěna její prodloužení, čehož bylo dosaženo vhodně zvoleným složením demembranačního roztoku. Platnost tohoto tvrzení potvrzuje i fakt, že limitujícím faktorem motility je vysoký obsah

TritonuX-100. Následná optimální dávka detergentu pak vede k demembraci a tím i k mnohonásobnému prodloužení doby pohybu.

Průměrné rychlosti zjištěné u jesetera malého v testovacích médiích v časech 15, 30 a 45 sekund (doplňené o směrodatnou odchylku, variační rozpětí a variační koeficient) jsou zaznamenány v tabulce (Tabulka 5.).

Tabulka 5.: Průměrné rychlosti pohybu spermií jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) v $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (hodnoty v rámci jednotlivých časů se stejným písmenem v indexu označení skupiny znázorňují skupiny, které se statisticky průkazně neliší ($\alpha= 0,05$); pokud není písmeno uvedeno, byla naměřena pouze jedna hodnota)

Rychlost v čase \ Médium	H ₂ O	DM-RM bez TritonuX-100 + ATP	3 : 1 DM-RM bez T. : DM-RM s T. + ATP
15 s (sm. odch.; var. koef.; var. rozp.)	135,55 ^B (56,14; 0,40; 301,19)	149,93 ^C (57,01; 0,40; 243,99)	64,12 ^A (32,50; 0,51; 90,59)
30 s (sm. odch.; var. koef.; var. rozp.)	115,58 ^A (57,78; 0,50; 286,69)	148,51 ^B (43,50; 0,29; 201,19)	0 (nebylo možno vypočítat)
45 s (sm. odch.; var. koef.; var. rozp.)	101,36 ^A (82,97; 0,87; 586,95)	127,91 ^B (57,09; 0,44; 216,48)	98,94 (naměřena pouze 1 hodnota)

Spermie jesetera jsou pohyblivé ve všech sledovaných časech, i ve všech sledovaných médiích, kromě roztoku demembranačně-reaktivačního média bez TritonuX-100 (ATP bylo obsaženo): demembranačně-reaktivačního média s Tritonem-100 v poměru 3:1, kdy nebyla v čase 30 s zjištěna žádná pohyblivá spermie. Statistickým porovnáním dat byly zjištěny průkazné odlišnosti středních hodnot naměřených rychlostí.

Motility spermií v testovacích médiích a časech (15, 30 a 45 s; včetně směrodatné odchylky, variačního rozpětí a variačního koeficientu) jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 6.).

Tabulka 6.: Motilita spermií jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) (v % živých spermií) (hodnoty v rámci jednotlivých časů se stejným písmenem v indexu označení skupiny znázorňují skupiny, které se statisticky průkazně neliší ($\alpha= 0,05$); pokud není písmeno uvedeno, byla naměřena pouze jedna hodnota)

Motilita v čase \ Médium	H ₂ O	DM-RM bez TritonuX-100 + ATP	3 : 1 DM-RM bez T. : DM-RM s T. + ATP
15 s (sm. odch.; var. koef.; var. rozp.)	46,28 ^A (30,50; 0,66; 98,21)	56,66 ^B (27,85; 0,49; 63,66)	6,39 ^C (1,71; 0,02; 3,21)
30 s (sm. odch.; var. koef.; var. rozp.)	48,11 ^A (30,30; 0,63; 98,21)	33,25 ^A (23,42; 0,70; 54,17)	0 (nebylo možno vypočítat)
45 s (sm. odch.; var. koef.; var. rozp.)	36,80 ^A (24,91; 0,68; 72,30)	22,26 ^A (18,82; 0,85; 45,74)	3,41 ^A (3,02; 0,88; 4,27)

Motilita v čase 15 s se ve všech používaných médiích statisticky průkazně odlišuje. Ve 30 s a 45 s nebyl rozdíl statisticky prokázán.

5. Diskuze

Pohyb spermií kapra v demembranačním médiu je srovnatelný s výsledky studie Linharta et al. (2003). Pohyb spermií jesetera malého odpovídá údajům zjištěným u veslonosa amerického (*Polyodon spathula*) (Linhart et al., 2002).

Kvalita používaného spermatu byla nízká, neboť experimenty byly realizovány mimo reprodukční sezónu používaných druhů. Kvalitu, zejména při pokusu se spermatem kapra, pravděpodobně ovlivnila nízká teplota vody v době odběru. Teplota vody v průběhu experimentu byla 18 °C, literatura pro daný druh uvádí 18 – 20 °C (Dubský et al., 2003). U jesetera, u kterého se výtěrová teplota pohybuje v rozmezí 12-17 °C (Dubský et al., 2003), bylo naměřených 15 °C adekvátních. Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem byla spermiogeneze u zkoumaných mlíčáků indukovaná uměle za použití hormonů. Kvalita odebraného spermatu tedy byla nižší (Redondo et al., 2003).

Experimenty byly prováděny pomocí takzvané jednostupňové metody, kdy byly složky demembranačního i reaktivačního média spojeny v jednom roztoku. Obdobný postup použili ve své studii Willams a Ford (2001). Naproti tomu v pracích Linharta et al. (2002) a Cosson et al. (1995) bylo použito metody, při které bylo pracováno ve dvou stupních, tedy se dvěma typy médií. V této práci bylo zvoleno užití jednostupňové metody z důvodu maximálního zjednodušení demonstračního experimentu.

Vyhodnocení pohyblivosti spermií bylo komplikováno přilnavostí spermií ke sklíčku způsobené pravděpodobně následkem provedené demembranace. Zde byly pohyblivé pouze bičíky, proto je nebylo možné zahrnout do konečných výsledků, z tohoto důvodu byl tedy jev vyhodnocen jako nežádoucí. Aby bylo zabráněno jeho vzniku byl ve vodném médiu použit pluronic, Linhart et al. (2002) však ve své práci použili BSA.

U jesetera malého by však bylo možné výše uvedený jev, kdy se spermie přichytí akrozinovým vláknem vzniklým po porušení akrozomu (tzv. akrozinová reakce (Pšenička et al., 2011)), využít ke studiu vlivu iontů (například těžkých kovů) na odhalený aparát bičíku.

Značnou komplikací při vyhodnocování experimentu byla nízká motilita spermií v demembranačně-reaktivačním médiu. Oproti literatuře (například Linhart et al., 2002)

bylo nutné upravit obsah TritonuX-100, který byl použit jako činidlo k destrukci cytoplazmatické membrány.

6. Závěr

Záměrem práce bylo shrnutí informací o metodě demembranace spermií ryb ve vztahu k aktivaci a fyziologii pohybu spermií a následné aplikace vybraného postupu v jednoduchém experimentu na spermiích jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) a kapra obecného (*Cyprinus carpio*).

Závěry práce lze shrnout do několika bodů:

- Možnost použití demembranace se potvrdila jak u zástupce kostnatých, tak u zástupce chrupavčitých, avšak motilita byla u demembranovaných spermií menší než u nativních.
- Klíčovým faktorem pro experimenty je kvalita čerstvého spermatu.
- V případě horší kvality spermatu můžeme u demembranovaných spermií dojít ve sledovaných parametrech k lepším výsledkům.
- Pro použití demembranace jako nástroje ke studiu je nutné pro každý druh a pro každé podmínky prověřit vhodnost složení média, zejména pak použité koncentrace detergentu.

7. Přehled použité literatury

Webové stránky:

1. http://www.herber.webz.cz/www_ocean/08-rybolov.html , cit.: 20.4.2012
2. <http://www.fao.org/fishery/en>

Publikace

- Alavi, S. M. H., Cosson, J., 2006. *Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review*. Cell Biology International, 30, 1, 1-14 s.
- Alavi, S. M. H., Cosson, J., Coward, K., Rafiee, G., eds., 2008. *Fish Spermatology*. Alpha Science Ltd, Oxford, UK., 465 s. ISBN 978-1-84265-369-2.
- Alavi, S. M. H., 2009. *Sperm motility and behavior in models of teleostean and chondrosteian fish: Motilita a chování spermií modelových druhů kostnatých a chrupavčitých ryb*. Vodňany, 2009. 146 s. Disertační práce. USB FFWP, RIFCH. ISBN 978-80-85887-84-6.
- Alavi, S. M. H., Gela, D., Rodina M., Linhart, O., 2011. *Roles of osmolality – Potassium antagonist and kalcium in activation and flagellar beating pattern of sturgeon sperm*. Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology, 160, 2, 166-174 s.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 1997. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Brno, Espero Publishing, 740 s., ISBN 80-902906-0-4 : 1050.00
- Ashizawa, K., Sakuragi, M., Tsuzuki, Y., 1998. *Temperature dependent flagellar motility of demembrated, cytosol free fowl spermatozoa*. Comparative Biochemistry and Physiology-A Molecular and Integrative Physiology, 121, 1, 83-89 s.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., 2008. *Biologie*. Brno, Computer Press, 1296 s.
- Cosson, M. P.; Cosson, J.; Andre, F.; Billard, R., 1995. *CAMP/ATP Relationship in the activation of trout sperm motility their interaction in membrane deprived models and in live spermatozoa*. Cell Motility and the Cytoskeleton, 31, 2, 159-176 s.
- Cosson, J., Groison, AL., Suquet, M., Fauvel, C., Dreanno, C., Billard. R., 2007. *Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers*. Reproduction. 136, 3, 277-294 s.
- Dubský, K., Kouřil, J., V. Šrámek, V., 2003. *Obecné rybářství*. Vydání první. Praha, Informatorium, 312 s. ISBN 80-7333-019-9.
- Linhart O., Šlechta V., Slavík T., 1991. *Fish sperm composition and biochemistry*. Bulletin of Institut of Zoology, Academia Sinica, monograph.16, 288-311 s.
- Linhart, O., Cosson, J., Mims, S. D., Shelton, W.L., Rodina, M., 2002. *Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (Polyodon spathula) spermatozoa*. Reproduction, 124, 5, 713-719 s.

- Linhart, O; Cosson, J; Mims, S. D., Rodina, M; Gela, D; Shelton, W. L., 2003. *Effects of ions on the motility of fresh and demembrated spermatozoa of common carp (Cyprinus carpio) and paddlefish (Polyodon spathula)*. Fish Physiology and Biochemistry, 28, 1-4, 203-205 s.
- Massanyi, L., 1991. *Funkčná morfológia spermie*. Bratislava, Veda, 196 s. ISBN 80-224-0149-8.
- Morisawa, M., 2008. *Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fish*. Journal of Applied Ichthyology, 24, 4, 362-370 s.
- Poupard, G. P., Gatti, J. L., Cosson, J., Jeulin, C., Fierville, F., Billard, R., 1997. *Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa*. Journal of Reproduction and Fertility, 110, 2, 315-327 s.
- Pšenička, M., 2009. *Ultrastructure of spermatozoa and fertilization process in sturgeon: Ultrastruktúra spermií a fertilizačného procesu jeseterů*. Vodňany, 2009. 104 s. Dizertační práce. USB FFWP, RIFCH. ISBN 978-80-85887-85-3.
- Pšenička, M., Vančová, M., Koubek, P., Těšitel, J., Linhart, O., 2009. *Fine structure and morphology of sterlet (Acipenser ruthenus L. 1758) spermatozoa and acrosin localization*. Animal Reproduction Science, 111, 1, 3-16 s.
- Redondo-Muller, C., Cosson, M. P., Cosson, J., Billard, R., 2003. *Invitro maturation of the potential for movement of carp spermatozoa molecular reproduction and development*, 29, 3, 259-270 s.
- Rozsypal, S., Doškař, J., Frynta, D., Homola, J., Horáček, I., Hůrka, K., Kalina, T., Kubišta, V., Kvaček, Z., Linc, R., Losos, B., Mazura, I., Mladá, J., Mladý, F., Nedvídek, J., Novotný, I., Pavlová, L., Slavíková, J., Slavíková, Z., Smrž, J., Šašek, V., Šebánek, J., Šmarda, J., Štys, P., Zrzavý, J., 2003. *Nový přehled biologie*. Praha, Scientia, 796 s., ISBN 80-7183-268-5 : 949.00
- Vodrážka, Z., 2002. *Biochemie*. Praha, Academia, 508 s., ISBN 80-200-0600-1 : 450.00
- Závodská, R., 2001. *Biologie buněk*, Praha, Scientia, 160 s., ISBN 80-86960-15-3 : 330.00
- Williams, K. M., Ford, W. C. L., 2001. *The motility of demembrated human spermatozoa is inhibited by free calcium ion activities of 500 nmol/l or more*. International Journal of Andrology, 24, 4, 216–224 s.

Zdroje ilustrací

1. <http://cmif.osu.edu/416.cfm>
2. http://cs.wikipedia.org/wiki/Cytoplazmatick%C3%A1_membr%C3%A1na
3. <http://images.yourdictionary.com/mitochondrion>
4. Alavi, S. M. H., Cosson, J., Coward, K., Rafiee, G., eds., 2008. *Fish Spermatology*. Alpha Science Ltd, Oxford, UK., 465 s. ISBN 978-1-84265-369-2.

8. Seznam vybraných zkratk

EDTA – kyselina etylendiamintetraoctová; používaná jako chelatační činidlo

EGTA – kyselina etylenglycoltetraoctová; používaná jako chelatační činidlo

DTT – dithiothreitol; činidlo běžně používané v biochemii jako ochranný prostředek proti oxidaci –SH skupin v thiolech a k redukci bisulfidů na thioly

9. Seznam použitých tabulek a obrázků

Obr.1.: Spermie kostnatých ryb

Obr.2.: Schéma hlavních strukturních součástí axonemy

Obr.3.: Rozdíly ve stavbě spermií chrupavčitých a kostnatých ryb

Obr.4.: Schéma aktivace pohybu spermie

Obr.5.: Trojrozměrné schéma cytoplasmatické membrány

Obr.6.: Stavba mitochondrie

Tabulka 1.: Doba pohybu spermií kapra obecného (*Cyprinus carpio*)

Tabulka 2.: Průměrné rychlosti pohybu spermií kapra obecného (*Cyprinus carpio*)

Tabulka 3.: Motilita spermií kapra obecného (*Cyprinus carpio*) (v % živých spermií)

Tabulka 4.: Doba pohybu spermií jesetera malého (*Acipenser ruthenus*)

Tabulka 5.: Průměrné rychlosti pohybu spermií jesetera malého (*Acipenser ruthenus*)

Tabulka 6.: Motilita spermií jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) (v % živých spermií)

10. Abstrakt

Demembrance spermií ryb jako nástroj studia fyziologie aktivace a pohybu spermií ryb

Cílem této práce bylo shrnutí dostupných informací o metodě demembrance jako nástroje ke studiu fyziologie aktivace a pohybu spermií ryb a následná jednoduchá demonstrace užití metody.

Demembrance spermií ryb je metoda, při které dochází k destrukci cytoplazmatické membrány (fosfolipidová dvouvrstva oddělující vnitřní prostředí buňky od vnějšího) za použití detergentu. V této práci byl použit jemný neiontový detergent TritonX-100.

Pokusnými druhy byl kapr obecný (*Cyprinus carpio*) jako zástupce kostnatých ryb a jeseter malý (*Acipenser ruthenus*), který patří mezi ryby chrupavčité.

Pohybové parametry (doba pohybu, rychlost pohybu, motilita) spermií kapra obecného byly testovány ve třech médiích: v H₂O, v demembranačně-reaktivačním médiu a v demembranačně reaktivačním médiu s ATP. Spermie jesetera malého byly testovány v H₂O, v demembranačně-reaktivačním médiu bez TritonuX-100, s ATP, a v demembranačně-reaktivačním médiu s TritonemX-100 a s ATP.

V H₂O se spermie kapra pohybovaly po dobu 30 s, v roztoku demembranačně-reaktivačního média nebyl pohyb zaznamenán, v demembranačně-reaktivačním médiu s ATP byly spermie pohyblivé déle než 5 min. Motilita a rychlost 15 s po aktivaci byla 9,63% a 34,82 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ u nativních vodou aktivovaných a 29,83% a 51,68 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ u demembranovaných spermií.

Spermie jesetera malého byly v H₂O pohyblivé po dobu 3 min, v demembranačně-reaktivačním médiu s TritonemX-100 se nepohybovaly ani po přidání ATP, proto byl upraven obsah detergentu. Bylo použito demembranačně-reaktivační médium bez TritonuX-100: demembranačně-reaktivační médium s Tritonem100 v poměru 3:1, zde došlo k aktivaci nízkého procenta spermií (6,39 %), následný pohyb trval déle než 5 min. Motilita a rychlost 15 s po aktivaci byla 46,28% a 135,55 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ u nativních vodou aktivovaných a 6,39% a 64,12 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ u demembranovaných spermií.

Práce potvrdila možnost demembrance jak u chrupavčitých, tak i u kostnatých ryb, přičemž pro zdárné využití metody byla klíčovým faktorem kvalita použitého

spermatu a předchozí ověření vhodných podmínek vzhledem ke studovanému druhu a místním lokálním podmínkám.

Klíčová slova: *ATP, bičík, cytoplazmatická membrána, demembranace, detergent, jeseter, kapr, motilita, spermie ryb,*

11. Abstract

The Demembration as a Tool to Study a Movement and Physiology of Activation of Fish Spermatozoa

The aim of the thesis was the summarization of information about the demembration method as a means of study of the physiology of activation and motility of fish spermatozoa. A simple demonstration of the method is also presented.

The demembration of fish sperm is a method, in which cytoplasmic membrane (the phospholipid bilayer, which separate intercellular and extracellular environments) is destroyed. A mild non-ionic detergent, TritonX-100, was used in the study.

Common carp (*Cyprinus carpio*) as a representative member of Teleost fish and sterlet as a member of Chondrostea (elasmobranch) fish were studied in the thesis.

Motility parameters of carp (time of motility, motility velocity, motility of live spermatozoa) was tested at three media: in H₂O, in demembration-reactivating medium and in demembration-reactivating medium with ATP. The sterlet spermatozoa was tested in H₂O, demembration-reactivating medium without TritonX-100 (but with ATP) and in demembration-reactivating medium with TritonX-100 and ATP.

Spermatozoa was motile for 30 seconds in H₂O and for longer than 5 minutes in the demembration-reactivating medium with ATP. It was not motile at all in the demembration-reactivating medium. Motility and velocity, which was measured 15 seconds after activation, was 9.63 % and 34.82 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ in native spermatozoa activated by the distilled water and 29.83 % and 51.68 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ in the demembrated spermatozoa.

The sterlet sperm was motile for 3 minutes in H₂O. It was not motile in the demembration-reactivating medium with TritonX-100 and it was still immotile when ATP was added. The composition of detergent was modified. The demembration-reactivating medium without TritonX-100 and demembration-reactivating medium with TritonX-100 at ratio 3:1 were used. A low percentage of spermatozoa (6.39 %) was activated. The subsequent motion lasted for more than 5 minutes. The motility and velocity, measured 15 seconds after the activation,

were 46.28 % and $135.55 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ for native sperm activated by distilled water and 6.39 % a $64.12 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ for demembrated spermatozoa.

The thesis confirms the possibility of demembration of Teleost and Chondrosteian fish. The limiting factors for successful application of this method were quality of spermatozoa and previous verification of optimal conditions for tested species and local conditions.

Keywords: *ATP, cytoplasmic membrane, carp, demembration, detergent, fish sperm, flagellum, motility, sterlet*