

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

Diplomová práce

Demembrance spermií ryb: návržení a ověření postupů u různých druhů sladkovodních ryb a demonstrace využití této techniky na příkladu studia vlivu těžkých kovů přímo na axonemu spermie

Autor: Bc. Jaroslava Blažková

Vedoucí diplomové práce: Ing. Marek Rodina, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Dr. Jacky Cosson, Dr.h.c a MSc. Galina Prokopchuk

Studijní program a obor: Zootechnika, Rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: Druhý

České Budějovice, 2014

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

Prohlašuji, že souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění. 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, 5.5.2014

.....

Poděkování:

Na prvním místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Ing. Marku Rodinovi, Ph.D. za trpělivé vedení a cenné rady. Děkuji také svým dvěma konzultantům Dr. Jackymu Cossonovi, Dr.h.c a MSc. Galině Prokopchuk a MSc. Borysi Dzyubovi, Ph.D. za pomoc cenné rady.

Za pomoc při obstarání a dopravě ryb děkuji prof. Janu Kouřilovi, Ph.D., RNDr Božku Drozdovi, Ph.D., Ing. Antonínu Koubovi, Ph.D., Ing. Pavlu Šablaturovi a Ing. Miroslavu Blechovi.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Zuzaně Mruzíkové a Aleně Břendové za jazykovou korekci práce.

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jaroslava BLAŽKOVÁ**
Osobní číslo: **V12N000P**
Studijní program: **N4103. Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Demembrance spermií ryb: navržení a ověření postupů u různých druhů sladkovodních ryb a demonstrace využití této techniky na příkladu studia vlivu těžkých kovů přímo na axonemu spermie**
Zadávající 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 :

Diplomová práce bude navazovat na bakalářskou práci Demembrance spermií ryb jako nástroj studia fyziologie aktivace a pohybu spermií ryb.

Cílem práce je:

Zpracování a prověření postupu demembrance spermií pro různé druhy ryb (min. 3).

Demonstrace využití této techniky například při studiu vlivu těžkých kovů přímo na axonemu spermie (nebo jiných, fyziologii pohybu spermie ovlivňujících vlivů).

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

Teoretický úvod může vycházet z předešlé práce, musí být však rozšířen o specifika zvolených druhů ryb a problematiku těžkých kovů či fyziologii pohybu spermie ovlivňujících vlivů.

Vlastní experimentální část bude probíhat v Laboratoři fyziologie reprodukce VÚRH stejnými technikami, jako předešlá bakalářská práce.

Výsledek práce musí zahrnovat:

Zhodnocení a porovnání navržených metod - postupů demembrance spermií zvolených druhů ryb.

Modelové využití demembranovaných spermií pro zvolený účel (aplikaci).

Praktické poznatky týkající se použitelnosti, výhod a omezení demembrance spermií.

Rozsah grafických prací: **max. 20 stran A4**

Rozsah pracovní zprávy: **max. 40 stran A4**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

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, 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

Williams, K. M.; Ford, W. C. L., AUG 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

Bezanehtak, H., Swan, M. A. DEC 1999. Study of demembrated, reactivated human spermatozoa with decondensed nuclei. JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY, 284 (7): 789-797

Brokaw, C. J., 1999. 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

Ashizawa, K., Sakuragi, M., Tsuzuki, Y., SEP 1998. Temperature-dependent flagellar motility of demembrated, cytosol-free fowl spermatozoa.

COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY A MOLECULAR AND INTEGRATIVE PHYSIOLOGY, 121 (1): 83-89

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Marek RODINA, Ph.D.**

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant diplomové práce: **Dr. Jacky Cosson, Dr. h. c.**

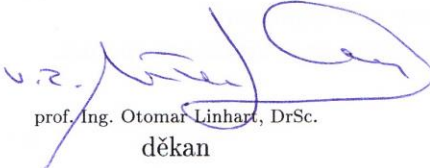
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Ostatní konzultanti: **MSc. Galina Prokopchuk**

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání diplomové práce: **7. prosince 2012**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2014**


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

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


doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. února 2013

OBSAH

1. Úvod.....	7
2. Literární přehled	9
2.1 Spermie ryb.....	9
2.2 Pohyb spermií ryb.....	10
2.2.1. Parametry pohybu spermií	10
2.3. Sperma ryb.....	12
2.3.1. Obecné charakteristiky spermatu ryb	12
2.3.2. Charakteristika spermatu modelových druhů ryb (použitých v této práci) ..	12
2.2.2.1. Kapr obecný (<i>Cyprinus carpio</i>)	12
2.3.2.3. Jeseter malý (<i>Acipenser ruthenus</i>).....	13
2.3.2.3. Okoun říční (<i>Perca fluviatilis</i>).....	13
2.3.2.4. Keříčkovec červenolemý (<i>Clarias gariepinus</i>).....	14
2.4. Demembranace spermií	15
2.4.1. Obecně o demembranaci.....	15
2.4.2 Demembranace jako proces	15
2.4.3. Média použitá při demembranaci	15
2.4.3.1. Složení demembranačních médií	16
2.4.4. Příklady použití demembranace.....	17
2.4.4.1. Zjištění vlivu iontů na axonemu rybí spermie	17
2.5. Vliv těžkých kovů na spermie ryb	18
2.5.1 Těžké kovy obecně	18
2.5.2. Těžké kovy ve vodním prostředí	19
2.5.3. Vliv těžkých kovů na organismus a reprodukci ryb	19
2.5.4. Vliv těžkých kovů na spermie ryb	20
2.5.5. Vliv těžkých kovů na pohybové parametry spermií	21
2.5.6. Působení těžkých kovů na demembranované spermie	23
3. Materiál a metodika	25
4. Výsledky	31
5. Diskuze	56
6. Závěr	62
7. Přehled použité literatury.....	63
9. Seznam použitých obrázků, tabulek a grafů	68
10. Abstrakt.....	71
11. Abstract.....	72

1. Úvod

S růstem lidské populace stoupá spotřeba potravin, tedy i ryb, s čímž souvisí i nárůst produkce získané z intenzivní akvakultury; celosvětová produkce akvakultury stoupla mezi lety 2003-2012 z 1 400 448 t ročně na 2 271 932 tun za rok (Dehasque, 2013).

Jedním z nejdůležitějších předpokladů rozvoje intenzivního chovu ryb je zvládnutí řízené reprodukce zájmových druhů. Řízená reprodukce ryb nachází uplatnění nejen v akvakultuře, ale také v ochraně ohrožených druhů ryb (Cataudella a Crosetti, 1993).

Úspěšnost řízené reprodukce ryb ovlivňuje mimo jiné i kvalita použitého spermatu. V akvakultuře se používá hormonální indukce spermiogeneze ryb (Kouřil et al., 2011), což může mít za následek proměnlivou kvalitu spermatu (Redondo et al., 2003).

Kvalitu používaného spermatu je možné zjistit za pomoci řady ukazatelů jako je například koncentrace (zjišťována např.: pomocí Bürkerovy komůrky) a procento pohyblivých spermií ve vzorku (Linhart et al., 2011). Dalšími používanými parametry jsou například rychlost, schopnost aktivace, průběh motility spermií apod. (Alavi et al., 2008).

Kvalitu spermií ryb ovlivňuje kromě řady vnitřních faktorů (např.: věk a kondice) také prostředí, v němž ryba žije (Dubský et al., 2003). Toto prostředí je určováno řadou fyzikálních faktorů, mezi které patří také znečištění (Hlaváček a Pepřík, 2013).

Znečištění vod, a zejména znečištění antropogenního původu, je v současnosti velkým problémem. Antropogenní znečištění může pocházet například ze zemědělství nebo z průmyslu. Mezi polutanty průmyslového původu patří například kyanidy či těžké kovy, mezi jejichž zdroje patří těžba, úprava kovů, chemický a kožedělný průmysl (Hlaváček a Pepřík, 2013).

Cílem této diplomové práce bylo navržení a demonstrace postupů demembrace u čtyř sladkovodních druhů ryb a to kapra obecného (*Cyprinus carpio*), jesetera malého (*Acipenser ruthenus*), okouna říčního (*Perca fluviatilis*) a keříčkovce červenolemého (*Clarias gariepinus*).

Jeseter malý byl vybrán jako zástupce chrupavčitých ryb, ostatní druhy patří mezi ryby kostnaté. Okoun říční byl zvolen vzhledem ke krátké době pohyblivosti spermií (do 30 s), keříčkovec červenolemý pak jako zástupce druhu, u kterého je v akvakulturní praxi využíváno testikulární sperma.

Dalším z cílů práce byla demonstrace využití techniky demembrace na příkladu vlivu těžkých kovů, konkrétně HgCl_2 , na pohybové parametry spermií, dále pak shrnutí praktických poznatků o demembraci, jejích výhodách a nevýhodách a zhodnocení použitých metod.

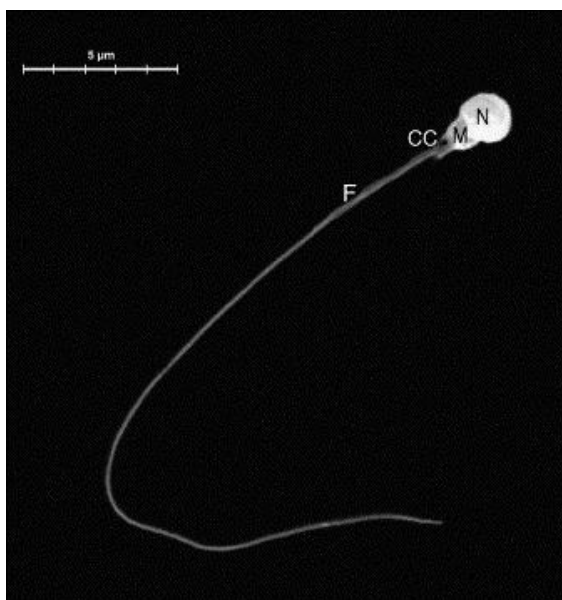
2. Literární přehled

2.1 Spermie ryb

Spermie je specializovaná samčí pohlavní buňka (gameta). Od běžných tělních buněk se liší velikostí; je malá a pohyblivá. Jejím úkolem je transport genetické informace samce do samičí gamety (vajíčka, tj. jikry u ryb) (Alberts et al., 1997, Alavi et al., 2008).

Spermie je diferencována na tři části a to hlavičku, střední oddíl (tzv. krček) a bičík (Alavi et al., 2008). V literatuře se však můžeme setkat i s dělením na dvě části – hlavičku a bičík. Střední oddíl je v tomto případě brán jako součást bičíku (Massanyi, 1991).

Hlavička spermie obsahuje jádro se samčí genetickou informací, která je oproti somatickým buňkám redukována na polovinu; spermie chrupavčitých ryb jsou opatřeny akrozomem, váčkem obsahující lytické enzymy usnadňující průnik do jikry (Pšenička et al., 2009, Alavi et al., 2012). Střední oddíl obsahuje mitochondrie spolu s primární a distální centriolární strukturou (Hatef, 2012). Bičík je pohybovou organelou spermie (Alavi et al., 2008).



Obr. 1.: Spermie lína obecného (*Tinca tinca*): N – jádro (hlavička), M – střední oddíl, CC – cytoplazmatický kanál, F – bičík (Pšenička et al., 2005)

2.2. Pohyb spermií ryb

V pohlavním traktu ryb s vnějším oplozením jsou spermie nepohyblivé, motilita je nastartována až po aktivaci v externím médiu (voda, aktivální roztok) v důsledku odlišné koncentrace iontů (osmolality) v semenné plasmě a v aktiválním médiu (Alavi et al., 2008, Dietrich et al., 2010).

Doba pohybu spermií v externím médiu je u kostnatých ryb krátká, cca 15-50 s (Linhart et al., 2004). U kapra obecného se pohybuje kolem 30 s ve vodném médiu. U chrupavčitých ryb je pohyblivost spermií delší, u veslonosa amerického (*Polyodon spathula*) i více než 9 min (Linhart et al., 2002), u vyzy velké (*Huso huso*) je 5-13 minut (Alavi et al., 2012). Během krátké doby (řádově za méně než 1 minutu, u kostnatých ryb během několika vteřin) po aktivaci se pohyb rychle rozvíjí. Asynchronní aktivace pohybu je způsobená heterogenními reakcemi během pohybu a trváním pohybu. V prvních okamžicích motility je také nejvyšší její rychlost (Alavi et al., 2008).

Základní rysy motility mohou být shrnuty do následujících bodů (podle Alaviho et al., 2008):

1) po spuštění motility zabírají vyvolané vlny většinu délky bičíku za současné konstantní amplitudy probíhající s vysokou frekvencí po celé délce bičíku

2) frekvence se snižuje v důsledku snižování koncentrace ATP ve střední části periody, zatímco šíření vln je omezené na proximální část bičíku a konec bičíku se narovná

3) během pozdějších fází motility jsou vlny lokalizovány pouze ve velmi malé oblasti bičíku za hlavičkou, zbytek bičíku je nepohyblivý

4) vlny se už neobjevují a bičík zůstává v napřímené poloze

Motilita spermií se může lišit v závislosti na různých podmínkách (poškození buňky, složení aktiválního média atd.). U spermií rozeznáváme tři hlavní druhy pohybu – jedná se o pohyb lineární, nelineární a kruhový. Při nízkých pohybových frekvencích jsou zaznamenávány typy nelineární a kruhový. Lineární typ pohybu dominuje (Alavi et al., 2008).

2.2.1. Parametry pohybu spermií

Pohyb spermií je charakterizován různými parametry (Alavi et al., 2008, Alavi et al., 2012). Za pomoci počítačové analýzy (CASA – computer asisted sperm analysis) měříme procento pohyblivých spermií, rychlost, frekvenci bičíku, délku

pohybových vln a jejich amplitudu (Alavi et al., 2012, Kime et al., 1999). Použitím CASA je možné rozlišit subletální vlivy polutantů na spermie včetně změn v rychlosti a trajektorii pohybu spermií (Dietrich et al., 2010).

Motilitu spermií dále charakterizují následující parametry (Kime et al. 1996):

- VCL (*curvilinear velocity*): křivočará rychlost ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), součet postupných pohybových vzdáleností na každém snímku dráhy spermie rozdělené do celého času stopy
- VSL (*straight line velocity*): lineární rychlost ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), přímá lineární vzdálenost mezi počátečním a koncovým bodem dráhy v celém čase stopy
- VAP (*angular path velocity*): rychlost úhlové dráhy ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), odvozená dráha založená na průměrném počtu bodů v celém čase stopy
- LIN: linearita (přímocí, %), poměr konečné pohybové vzdálenosti k totální dráhové vzdálenosti
- MAD (*mean angular displacement*): průměrný úhlový posun ($^{\circ}$), průměrná změna směru hlavičky spermie mezi jednotlivými snímky
- MOC (*motile concentration*): koncentrace pohyblivých buněk (miliardy na ml)
- STR (*straightness*): přímost (%), poměr konečné pohybové vzdálenosti k totální dráhové vzdálenosti
- ALH (*amplitude of lateral displacement of the sperm head*): amplituda laterálního posunutí hlavičky spermie (μm), průměrná odchylka od plynulé dráhy založená na rozdílu v linearitě mezi plynulou a skutečnou dráhou spermie
- BCF (*beat cross frequency turning points of the sperm head*): frekvence úderů křížení bodů otáčení hlavičky spermie (Hz), odchylky hlavičky od průměrné dráhy za vteřinu

Pohybové parametry spermií ryb po aktivaci spermatu v aktivačním médiu rychle klesají. Což znamená, že se každý měřený parametr musí vztahovat ke konkrétnímu časovému bodu, během kterého je změřen. Tato skutečnost je aplikovatelná na většinu druhů ryb (Alavi et al., 2008). K poklesu motility dochází díky poklesu intracelulárního ATP, energetického zdroje pro údery bičíku (Alavi et al., 2012).

2.3. Sperma ryb

2.3.1. Obecné charakteristiky spermatu ryb

Sperma ryb obsahuje spermie a semennou plasmu. Semenná plasma je zejména produktem Sertoliho buněk a tvoří většinu (50 % - 90 %) spermatu ryb. Spermialní plasma se liší od ejakulátu teplokrevných živočichů, neboť ryby nemají přídatné pohlavní žlázy (Linhart et al., 2011). Spermie jsou v plasmě obvykle nepohyblivé (Linhart et al., 1991).

Semenná plasma obsahuje různé kationty Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} a také organické komponenty (glycidy, proteiny, lipidy atd.). Obsah iontů a jejich působení ovlivňuje pohyblivost spermií. Draselné kationty působí jako inhibitory motility, antagonisticky působí ionty vápníku, hořčíku a sodíku (Linhart et al., 1991). Koncentrace iontů ovlivňuje aktivaci pohybu spermií (Alavi et al., 2012), například u lososovitých ryb vyvolává motilitu pokles extracelulárního draslíku (Alavi et al., 2008). Motilitu u chrupavčitých a některých kostnatých ryb ovlivňuje iontový efekt zároveň s osmotickým tlakem (Linhart et al., 2010). Koncentrace vápenatých iontů má rozdílný vliv na motilitu demembranovaných a nativních spermií (Alavi et al., 2008).

Kromě iontů jsou v semenné plasmě přítomny také produkty metabolismu sacharidů a Krebsova cyklu, například laktát, pyruvát a α -ketoglutarát, jejichž koncentrace během skladování spermatu rostou, a malát s izocitrátem, jejichž koncentrace naopak klesají (Linhart et al., 1991). Sperma obsahuje také enzymy, z nichž se dá zjistit metabolická aktivita spermií. Jedná se například o NAD^+ koenzymy, o enzymy NAD^+/NADH a $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. Ve spermatu byly izolovány také různé typy fosfatáz, esteráz, peptidáz a glukosamidáz (Linhart et al., 1991).

2.3.2. Charakteristika spermatu modelových druhů ryb (použitých v této práci)

2.2.2.1. Kapr obecný (*Cyprinus carpio*)

Kapr obecný je kosmopolitně rozšířená ryba s původní oblastí výskytu ve východní Evropě a Asii. Mlíčáci pohlavně dospívají ve třetím až čtvrtém roce, jikernačky o rok později (Dubský et al., 2003).

Sperma kapra je bělavé, husté, s dobrou pohyblivostí spermií, objem spermatu získaného od jednoho samce se pohybuje v rozmezí 5-50 ml (Linhart et al., 2011).

Koncentrace spermií v 1 ml spermatu je $15-25 \times 10^9$ (Rodina et al., 2010). Doba motility spermií je v průměru až 2 minuty (Linhart et al., 2011).

Spermie kapra mají kulovitou hlavičku bez akrosomu (Alavi et al., 2008). Celková délka spermií kapra je 45-45,5 μm (Pšenička et al., 2009), délka hlavičky 2-2,5 μm (Massar et al., 2011, Pšenička et al., 2009), střední části $0,70 \pm 0,24 \mu\text{m}$ (Pšenička et al., 2009) a bičíku 43 μm (Pšenička et al., 2009)

2.3.2.3. Jeseter malý (*Acipenser ruthenus*)

Jeseter malý se vyskytuje v Evropě a v Asii v úmoří Černého, Azovského a Kaspického moře. V České republice se vykytuje v povodí řek Moravy a Dyje. Mlíčák pohlavně dospívá ve třetím až pátém roce, jikernačky ve věku čtyř až sedmi let (Dubský et al., 2003).

Sperma jeseterovitých ryb je bělavá až mléčně bílá tekutina vodnaté konzistence. Množství spermatu od jednoho mlíčka jesetera malého se pohybuje v řádu jednotek mililitrů (Gela et al., 2008), od mlíčka o hmotnosti 1 kg můžeme očekávat cca do 20 ml spermatu (Linhart et al., 2010). Koncentrace spermií v 1 ml je $0,1 \times 10^9$ (Linhart et al., 2010).

Doba pohybu spermií jesetera malého je 4-5 minut (Alavi et al., 2012), pohyb je vyvolán hypoosmotickým šokem (Alavi et al., 2009). Kromě změny osmotického tlaku se v aktivaci pohybu spermií jeseterů uplatňuje také antagonismus draslíku a vápníku; přítomnost K^+ působí jako inhibitor motility (Alavi et al., 2008, Linhart et al., 2010).

Na hlavičce spermie se nachází akrozom, váček s lytickými enzymy usnadňujícími průnik do jikry (Pšenička, 2009, Alavi et al., 2012). Délka spermie jesetera malého je 47,61 μm , akrosomu 0,79 μm , hlavičky (jádra) 3,3 μm , střední části 0,97 μm , bičíku 47,61 μm (Alavi et al., 2012).

2.3.2.3. Okoun říční (*Perca fluviatilis*)

Okoun říční je sladkovodní dravá ryba žijící v severní Evropě a Asii (Hatef et al., 2010). V přírodě dospívá samec ve dvou až třech letech, jikernačka o rok později (Dubský et al., 2003).

Sperma okouna je bělavé a velmi husté, koncentrace spermií činí $3,5-4,4 \times 10^9$ v 1 ml. Množství odebraného spermatu je velmi různorodé, od 0,5 po 7 ml (Policar et al., 2009). Vzhledem k vysoké hustotě a riziku kontaminace močí (okoun má močový měchýř) je nutné jeho ředění imobilizačním roztokem (Linhart et al., 2011, Policar et al., 2009).

Spermie jsou v semenné plasmě o osmotickém tlaku 300 mOsm.kg^{-1} nepohyblivé. Zralé spermie jsou aktivovány osmotickým šokem po přechodu do externího prostředí (Hatef et al., 2011). Spermie okouna se v externím médiu pohybují po krátkou dobu, někdy i méně než 15 s (Linhart et al., 2011).

Spermie mají asymetrický tvar hlavičky, bičík se připojuje mediolaterálně od jádra (Hatef et al., 2011). Celková délka spermií okouna je 32-37 μm (Alavi et al., 2008), hlavičky $1,87 \pm 0,16 \mu\text{m}$, střední části $0,87 \pm 0,07 \mu\text{m}$ (Lahnsteiner et al., 1995 in Alavi et al., 2008), bičíku 30-35 μm (Alavi et al., 2008).

2.3.2.4. Keříčkovec červenolemý (*Clarias gariepinus*)

Keříčkovec červenolemý (synonymum keříčkovec jihoafrický, dříve sumeček africký), který pochází z Afriky a Blízkého Východu, se od výše popsaných druhů ryb liší především způsobem získávání spermatu (Hamáčková et al., 2007, Rurangwa et al., 1997) od ryb z akvakultury.

Samci dosahují optimální zralosti gonád ve věku 1,5-2 roky, jikernačka pohlavně dospívá ve věku 6 měsíců (Hamáčková et al., 2007). Sperma produkují po celý rok. V akvakulturní praxi však k jeho uvolňování nedochází za pomoci řízeného manuálního výtěru, nýbrž preparací gonád po zabití samců (Rurangwa et al., 1997). Vypreparované gonády se po osušení rozstříhají nůžkami a propasírují do nádoby či přímo na jikry přes uhelon či jinou jemnou tkaninu, popřípadě přes suché sítko (Hamáčková et al., 2007, Kouřil et al., 2013).

Množství spermatu je velmi nízké (Mansour et al., 2005); gonadosomatický index (GSI) činí méně než 1 % živé hmotnosti, z tohoto důvodu se používá testikulárního spermatu (Urbányi et al., 1999).

Steyn a van Vuren (1987) popsali ve své studii následující charakteristiky spermatu keříčkovce jihoafrického: barva bělavá, konzistence řídká, doba pohybu max. 1-1,5 minuty, průměrná doba pohybu je cca 30-45 s (Urbányi et al., 1999). Urbányi et al. (1999) zjistili v testikulárním spermatu koncentraci spermií $8,2 \pm 2,0 \times 10^9$ v 1 ml.

Celková délka spermií keříčkovce červenolemého je $38,86 \pm 1,46 \mu\text{m}$, hlavičky $1,55 \pm 0,1 \mu\text{m}$, střední části $0,51 \pm 0,06 \mu\text{m}$, bičíku $37,8 \pm 1,3 \mu\text{m}$ (Mansour et al., 2002).

2.4. Demembranace spermií

2.4.1. Obecně o demembranaci

Demembranace je proces, při kterém dochází k destrukci cytoplasmatické membrány za použití detergentu, například TritonX-100 (Linhart et al., 2002) či Nonidet-40 (Ashizava et al., 1998). Odstranění či narušení membrány umožňuje přímé působení látek, např.: iontů, na buněčné struktury (Poupard et al., 1997); v případě spermií se jedná též o působení aktivačního média (voda, aktivační roztok) (Linhart et al., 2002).

Pohybový aparát spermie zůstává při demembranaci neporušen, což umožňuje sledovat působení látek přímo na axonemu spermie; může však dojít k poškození struktur axonemy. Můžeme tak ověřit mechanismy působení látek, např.: polutantů, obsažených v prostředí na spermii (Lahnsteiner et al., 2004).

2.4.2 Demembranace jako proces

Demembranace jako proces může být prováděna v jednom (tzv. jednostupňová metoda) (Linhart et al., 2003, Williams a Ford, 2001), či ve dvou krocích (tzv. dvoustupňová metoda) (Cosson et al., 1995, Linhart et al., 2002).

Demembranaci provádíme pomocí demembranačního a reaktivačního média (Rendondo-Muller et al., 2003, Cosson et al., 1995), v případě postupu jednokrokového pak v médiu demembranačně-reaktivačním (Williams a Ford, 2001), kdy dochází k demembranaci a následné reaktivaci spermií ve stejném roztoku. K vlastní reaktivaci dochází po přidání ATP, ATP-Mg²⁺ (Linhart et al., 2002) či např.: cAMP (Cosson et al., 1995, u pstruha duhového).

2.4.3. Média použitá při demembranaci

V závislosti na zvoleném postupu demembranace, a následné reaktivace, se používá buď médium demembranačně-reaktivačního, a nebo demembranačního a reaktivačního média.

Demembranační médium složí k destrukci cytoplasmatické membrány. Jeho složení je odlišné v závislosti na prováděném experimentu, základem je však detergent; obvykle se jedná o neiontový detergent TritonX-100. Nezbytnou součástí každého roztoku je látka, která zabrání přilnavosti spermií k podložnímu sklíčku, ve většině studií je použito BSA (hovězí sérový albumin) (např.: Linhart et al., 2002, Cosson et al., 1995, Ignatz a Suarez, 2005), ale Boryshpolets et al. (2013) použili ve své práci pluronic. Podrobněji se složením média zabývá podkapitola 2.4.3.1. Složení demembranačních médií.

Reaktivační médium má za úkol obnovit pohyblivost demembranovaných spermií. K tomu je nutné přidání adenosintrifosfátu (ATP), neboť při demembranaci dochází k destrukci cytoplasmatické membrány a také mitochondrie, membránové organely produkující ATP.

2.4.3.1. Složení demembranačních médií

Procesu demembranace se zúčastní látky s rozdílnými funkcemi, o kterých pojednávají následující body:

- TritonX-100: neiontová povrchově atraktivní látka (detergent) používaná pro změnu membránových komponent za jemných ne-denaturujících podmínek (www.sigmaaldrich.com)
- octan draselný: pufr užívaný při výzkumech v molekulární biologii, například pro izolaci DNA, pro úpravu pH roztoků (www.sigmaaldrich.com)
- DTT (dithithreitol): používá se ke stabilizaci enzymů a dalších bílkovin s volnými sulfhydrylovými skupinami, obnovuje aktivitu ztracenou po in vitro oxidaci těchto skupin (www.thermoscientificbio.com)
- EDTA (ethyltetraamintetraoctová kyselina): chelatační činidlo schopné vázat vápník a další dvoumocné kationty, sloužící k eliminaci inhibice enzymaticky katalizovaných reakcí způsobených stopami těžkých kovů (www.sigmaaldrich.com)
- EGTA (ethylglykol-bis(2-aminoethylether) - N, N, N', N'- tetraoctová kyselina): chelatační činidlo používané pro stanovení vápníku za přítomnosti hořčíku, sloužící k eliminaci inhibice enzymaticky katalyzovaných reakcí způsobených stopami těžkých kovů (www.sigmaaldrich.com)

- Tris (tris (hydroxymethyl) aminomethan), Tris-HCl: pufr používaný v biochemických reakcích (www.sigmaaldrich.com)
- sacharóza: neiontová součást médií, použití pro vytvoření hustotního gradientu buněk (Williams a Ford, 2001, www.sigmaaldrich.com)
- glukóza: neiontová součást médií, použití pro vytvoření hustotního gradientu buněk (Poupard et al., 1997, www.sigmaaldrich.com)
- glutamát sodný ($C_5H_7K_2NO_4$):
- ATP (Mg-ATP, Na_2 -ATP, adenosintrifosfát): zdroj energie pro pohyb spermií a další významné pochody v organismu (př.: dýchání), koenzym (www.sigmaaldrich.com, Vodrážka, 2002); Mg-ATP- P_2 purienergetický antagonist, zvyšující aktivitu Ca^{2+} -aktivujících K^+ kanály; substrát pro ATP–závislé enzymové systémy (www.sigmaaldrich.com)
- cAMP (cyklický adenosinmonofosfát): přirozeně se vyskytující aktivátor cAMP–závislé proteinkinázy, sekundární posel zapojený v mnoha systémech neurotransmiterů; cAMP/PKA signální dráha inhibuje proliferaci, vyvolává buněčné dělení a může vést k apoptóze (www.sigmaaldrich.com)
- BAPTA (1, 2- bis (2-aminofenoxy) ethan-N, N, N', N'- tetraoctová kyselina): sloučenina, která váže vápenaté kationty, významná pro koordinaci vápenatých a ostatních kovových iontů (www.sigmaaldrich.com)
- iontové komponenty směsi používané k úpravě osmotických charakteristik média (Linhart et al., 2002 a 2003, Poupard et al., 1997, Redondo et al., 1991):
 - chlorid hořečnatý ($MgCl_2$)
 - chlorid vápenatý ($CaCl_2$):
 - chlorid sodný (NaCl):
 - chlorid draselný (KCl):
 - síran hořečnatý ($MgSO_4$):

2.4.4. Příklady použití demembrance

2.4.4.1. Zjištění vlivu iontů na axonemu rybí spermie

Motilitu spermií ryb a její aktivaci ovlivňuje koncentrace iontů v prostředí. Při přechodu z vnitřního prostředí těla ryby do vnějšího prostředí dochází ke změně iontové koncentrace (osmolality) a tím i k aktivaci spermií (Alavi et al., 2008).

Vliv rozdílných koncentrací iontů v prostředí na spermie ryb zkoumal například Linhart et al. (2002) u veslonosa amerického (*Polyodon spathula*), kdy KCl nebo K^+ přítomný v reaktivačním médiu v koncentraci 5-15 mM inhiboval pohyb demembranovaných spermií. Po přidání 20 mM NaCl a dodání 50-200 μ M cAMP došlo k reaktivaci všech spermií, přičemž efekt byl výraznější při použití 0,5 mM $CaCl_2$.

Vlivem iontů na pohyblivost nativních a demembranovaných spermií se ve své studii zabývali Redondo et al. (1991). Zde došlo k periodickému poklesu motility a následně až k jejímu zastavení při koncentraci 200 mM KCl. Po demembraci a následné reaktivaci s přidáním ATP- Mg^{2+} byly spermie opět schopny pohybu.

Poupard et al. (1997) přidávali demembranované spermie do roztoku s nízkým obsahem glukózy (koncentrace 0-0,05 mM) a osmolalitou 60-140 mOsm.kg⁻¹. V médiu obsahujícím glukózu, nikoliv však Na^+ a K^+ , byl axonemální pohyb zaznamenán pouze po přidání méně než 25 mM KCl nebo NaCl (osmolalita cca 100 mOsm.kg⁻¹).

V případě, že byl v reaktivačním médiu obsažen KCl, NaCl či cholinchlorid, dosahovala motilita reaktivovaných spermií v médiu s osmolalitou 140-400 mOsm.kg⁻¹ 95 %; v reaktivačním médiu o osmolalitě 480-550 mOsm.kg⁻¹ byla pozorována motilita 80-90 % po dobu kratší 10 s, poté však došlo k rapidnímu poklesu, při osmolalitě 600-650 mOsm.kg⁻¹ již nebyla motilita zjištěna vůbec (Poupard et al., 1997).

Tyto výsledky prokázaly, že nízké koncentrace iontů nezpůsobily poškození pohybového aparátu, tudíž mohl zůstat funkční i v tomto prostředí (Poupard et al., 1997).

2.5. Vliv těžkých kovů na spermie ryb

2.5.1 Těžké kovy obecně

Těžké kovy jsou prvky skupiny B. Jedná se o prvky přechodné, tedy o prvky s neúplně obsazenými d-orbitaly (Vacík et al., 1990). Mají značný vliv na organismus. Působí jako inhibitory řady enzymů – například formou kompetice o vazebná místa v enzymech, a tak narušují biochemické pochody v organismu (Vodrážka, 2002).

V řadě reakcí působí d-prvky jako katalyzátory (Vacík et al., 1990, Vodrážka, 2002) či jsou nezbytnou součástí životně důležitých sloučenin (např. železo v hemoglobinu) (Crowe a Bradshaw, 2010, Vacík et al., 1990, Vodrážka, 2002).

Vzhledem ke schopnosti bioakumulace a nondegradabilitě jsou těžké kovy významnou hrozbou pro vodní prostředí (Sarosiek et al., 2009).

2.5.2. Těžké kovy ve vodním prostředí

Těžké kovy se ve vodním prostředí vyskytují v koncentracích řádově nižších, než jaké ovlivňují pohyblivost spermií ryb. Jediný zinek se vyskytuje v koncentracích ovlivňujících motilitu spermií. Pro ostatní těžké kovy převyšují efektivní koncentrace limity pro povrchové vody stanovené WHO – v případě kadmia a niklu sto až desettisíckrát, v případě rtuti dvěstěpadesátkrát až desettisíckrát, olova sto padesát až desettisíckrát, mědi stokrát a zinku desetkrát až stokrát (Lahnsteiner et al., 2004).

Pitter (1999) uvádí v povrchových vodách koncentrace zinku 5-200 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (max. 1 mg.l^{-1}), $> 1 \mu\text{g.l}^{-1}$ kadmia a 0,05 $\mu\text{g.l}^{-1}$ rtuti, nikl uvádí v jednotkách $\mu\text{g.l}^{-1}$. Norma ČSN 75 7221 udává mezní koncentrace 20-500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ zinku, 3-20 $\mu\text{g.l}^{-1}$ kadmia, 0,1-1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ rtuti a 20-500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ niklu.

Zvýšené koncentrace polutantů jsou pro ryby letální (např.: LD_{50} olova = 1,17 mg.l^{-1} (96 h) pro pstruha duhového, LD_{50} kadmia = 0,14 mg.l^{-1} (24h) pro ryby obecně, LD_{100} mědi = 0,8 mg.l^{-1} (2-3 dny) pro pstruha duhového) (Lahnsteiner et al., 2004).

2.5.3. Vliv těžkých kovů na organismus a reprodukci ryb

Těžké kovy se akumulují ve tkáních, v nichž mohou být následkem bioakumulace sto až desettisíckrát vyšší koncentrace těžkých kovů (například rtuti) než v okolním prostředí (Hatef et al., 2011); příliš vysoké koncentrace v prostředí mohou vést až ke smrti organismu (Chyb et al., 2001). Pro karnivorní druhy je bioakumulace z potravy vysoká (Kime et al., 1996).

Z hlediska vlivu na organismus je jedním z nejtoxičtějších kovů rtuť; její vliv na organismus se projevuje narušením fyziologických procesů. V rybím mase se rtuť vyskytuje z velké části v podobě metylrtuti (McIntyre, 1973, Chyb et al., 2001), což je organická sloučenina rtuti s toxicitou vyšší než anorganické sloučeniny kovu (Chyb et al., 2001).

Ionty rtuti ovlivňují závěrečné fáze reprodukce, vitelogenezi, produkci gonadotropinů, snižují hladinu hormonů a enzymů ovládajících reprodukci (Chyb et al., 2001) snižují schopnost spermií oplodnit jikry, líhnivost a životaschopnost a pohyblivost spermií (Dietrich et al., 2010).

Rtuťnaté ionty jsou vysoce reaktivní a mají značnou afinitu k makromolekulám, váží se například k DNA a způsobují změnu struktury cytoplasmatické membrány, které následně ovlivňují procento pohyblivých spermií (Dietrich et al., 2010). Ovlivňují i aktivitu ATPázy (adenosin fosfatázy), která hydrolyzou ATP poskytuje energii pro aktivitu (Hatef et al., 2011). Rtuť také interaguje s –SH skupinami enzymů; vedlejším efektem této interakce je vzestup hladiny reaktivních kyslíkatých sloučenin (reactive oxygen species, ROS) uplatňujících se jako antioxidanty; peroxid vodíku může způsobovat fragmentaci DNA ve spermiích pstruha duhového (Dietrich et al., 2010).

Ionty kadmia ovlivňují mechanismy reprodukce ryb jako například sezónní hormonální cykly, spermatogenezi a mohou také způsobovat degeneraci testes prostřednictvím kadmiové nekrózy (Dietrich et al., 2010). Toxicita kadmia klesá v přítomnosti ostatních bivalentních iontů například zinku, pravděpodobně díky kompetici kadmia a zinku o vazebná místa v proteinech či metaloproteinech v membráně spermie (Dietrich et al., 2010, Kime et al., 1999).

Zinek je esenciální minerál a jeho deficit způsobuje reprodukční dysfunkce u savců a ryb; klíčovou roli hraje zinek ve spermatogenezi, motilitě spermií, ochraně proti oxidaci, chromatinové kondenzaci a na zinku závislých enzimech a enzymatické aktivitě spojené s fosforylací proteinů (Dietrich et al., 2010). Snižuje toxický efekt kadmia, avšak způsobuje dřívější (o několik dní) syntézu metalothioneinu. Délka expozice těžkému kovu může být příčinou indukce syntézy (Kime et al., 1996).

2.5.4. Vliv těžkých kovů na spermie ryb

Většina kostnatých (*Teleostei*) a chrupavčitých (*Chondrostei*) ryb má externí oplození a jejich spermie jsou velmi jednoduché buňky (Alavi et al., 2008), které nejsou uzpůsobeny k vyrovnání vlivů vnějšího prostředí a jsou velmi senzitivní ke změnám prostředí, speciálně pak k polutantům (Lahnsteiner et al., 2004).

Koncentrace polutantů ovlivňující pohyblivost spermií mohou být různé vzhledem ke druhu ryby a typu polutantu (Lahnsteiner et al., 1996). Například kaprovité ryby jsou ke kontaminaci rtuťí více tolerantní než jiné druhy, pokles pohybových parametrů pozoroval Kime et al. (2001) při koncentraci 1 mg.l^{-1} (1 ppm).

Způsob ovlivnění spermií těžkými kovy je komplexní. Kromě narušení proteinů cytoplasmatické membrány, ovlivňují těžké kovy i membránové vodní kanály a póry zodpovědné za osmotickou regulaci a aktivaci pohybu buněk (Dietrich et al., 2010).

Fyziologický mechanismus ovlivnění rychlosti spermií ryb těžkými kovy není dosud přesně znám; studie naznačují vztah mezi motilitou spermií a oplozeností jiker a obsahem zinku a kadmia v potravě ryb (Kime et al., 1996). Nicméně vysoká rychlost pohybu spermií exponovaných v roztoku těžkých kovů může být vyvolána hyperaktivací metabolismu spermie. Roli zde hrají pravděpodobně i další vlivy jako je přítomnost iontových kanálů a membránový potenciál (Lahnsteiner et al., 2004).

Je několik možných mechanismů, jak mohou těžké kovy ovlivňovat aktivaci a pohyb spermií. Těžké kovy se mohou navázat na proteiny bičíku (díky vysoké propustnosti cytoplazmatické membrány pro molekuly s malou molekulovou hmotností – Campbell a Reece, 2008, Alberts et al., 1997, která jim umožní průnik do buňky – Lahnsteiner et al., 2004); tyto proteiny ovlivňují symetrii pohybu a frekvenci úderů bičíku nebo na enzymy ovlivňující metabolismus buňky (Dietrich et al., 2010, Abacal et al., 2007).

Působení těžkých kovů může ovlivnit i samotnou vnitřní organizaci bičíku (Lahnsteiner et al., 2004). Příkladem může být poškození bičíku způsobené afinitou rtuti k proteinovým funkčním skupinám obsahujícím síru, které jsou přítomny v membránách bičíku, v bičíkové matrix a vnějších longitudálních vláknech (van Look a Kime, 2003). Struktura bičíku tak může být změněna a také může dojít ke změně klouzání mikrotubulů řízeného dyneiny. Reakce rtuťnatých iontů s –SH skupinami tak vede až k inhibici proteinové aktivity, k denaturaci proteinů či změnám v konformaci bičíkových bílkovin (Dietrich et al., 2010), což může vést až ke zlomení či zkroucení bičíku (Abascal et al., 2007, Cosson et al., 1983). Zaznamenán byl také negativní vliv na produkci energie mitochondriemi (van Look a Kime, 2003).

2.5.5. Vliv těžkých kovů na pohybové parametry spermií

Pohybové parametry spermií jsou ovlivněny již bezprostředně po rozředění spermatu v roztoku s těžkými kovy (Dietrich et al., 2010, Kime et al., 1996). Redukce motility závisí na koncentraci těžkých kovů v médiu (Sarosiek et al., 2009).

Změny, ke kterým u pohybových parametrů spermií dochází, se od sebe mohou lišit. Různé jsou i změny motility, ke kterým působením těžkých kovů dochází. Ty mohou být:

1. pokles stupně motility, ačkoli rychlost plavání zůstává konstantní,
2. pokles motility a rychlosti plavání,

3. růst rychlosti plavání, přestože stupeň motility je konstantní,
4. vzestup rychlosti plavání, zatímco stupeň pohyblivosti klesá,
5. vyšší variabilita v parametrech motility (stupeň i rychlost) než v kontrole (Lahnsteiner et al., 2004).

Z pohybových parametrů ovlivňuje procento pohyblivých spermií nejvíce kadmium; pokles motility je závislý na koncentraci ke kompletní inhibici dochází u spermií pstruha duhového při koncentraci $100 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$, k 50 % inhibici pak při $10 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ (Dietrich et al., 2010). V roztoku obsahujícím kadmium a také zinek v koncentraci 100 ppm a vyšší byla zaznamenána vyšší motilita spermií keříčkovce červenolemého (*Clarias gariepinus*) než v případě roztoku, kde se nachází samotné kadmium (Kime et al., 1996).

U pstruha duhového způsobují rtuťnaté ionty v koncentraci 1 mg.l^{-1} pokles linearit dráhy spermie (LIN), rychlosti úhlové dráhy (VAP) a přímosti dráhy (STR), avšak hladiny MAD a DMN stoupají. Koncentrace 10 mg.l^{-1} zapříčiňuje snížení procenta pohyblivých spermií (42,5 %, pohyblivost v kontrole byla 71,2 %), VSL a LIN se souběžným vzrůstem hodnot ALH, MAD a DMN (Dietrich et al., 2010).

Vysokou variabilitu ve změnách motility pozorovali Lahnsteiner et al. (2004) u pstruha potočního (*Salmo trutta m. fario*) v případě vystavení spermií působení niklu, olova a zinku, u keříčkovce červenolemého (*Clarias gariepinus*) za použití olova a zinku a u jelce jesena (*Leuciscus cephalus*) v případě rtuti; keříčkovec červenolemý vykazoval ze všech pozorovaných druhů nejvyšší odolnost vůči polutantům, naproti tomu spermie pstruha obecného vykazovaly nejvyšší senzitivitu.

Efektivní koncentrace pro spermie keříčkovce červenolemého byla v případě zinku $75 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ kadmia $25 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ (Lahnsteiner et al., 2004). Obdobně je tomu i ve studii Kime et al. (1996), kde je efektivní koncentrace kadmia $5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ a zinku $15 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$.

Chlorid rtuťnatý HgCl_2 v koncentraci 1 mg.l^{-1} způsobuje pokles motility spermií karase stříbřitého (*Carrasius auratus*) interferencí s mikotubulárním systémem a redukcí hladiny mitochondriální energie (van Look a Kime, 2003), ale ačkoli tato koncentrace neovlivňuje délku bičíku, může narušit některé mikrotubuly, a tím oslabit údery bičíku (van Look a Kime, 2003).

V roztoku obsahujícím 100 mg.l^{-1} má velký podíl spermií zkrácený bičík vzhledem k velikosti dávky rtuti (van Look a Kime, 2003). Naproti tomu čtyřiaadvacetihodinová expozice spermií v 1 mg.l^{-1} chloridu rtuťnatého má za následek zkrácení nebo destrukci bičíku u 98 % spermií a tím i pokles jejich motility a také změnu permeability spermií (van Look a Kime, 2003).

U spermií pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) vystavených po dobu 30 minut koncentracím methylrtuti $1-10 \text{ mg.l}^{-1}$ dochází k poklesu motility (McIntyre, 1973).

2.5.6. Působení těžkých kovů na demembranované spermie

Působení těžkých kovů na demembranované spermie mořčáka evropského (*Diecentrarchus labrax*) zkoumali ve své práci Abascalet et al. (2007), přičemž použili dvoustupňové metody demembrace. Dvacet μl spermií (řaděných v neaktivujícím médiu 1:2500) nejprve demembranovali v demembranačním médiu o složení: octan draselný – 75 mM, DTT – 1mM, CaCl_2 – 0,5 mM, Tris-HCl – 20mM, TritonX-100 – 0,04% (w/v); pH = 8,2. Po 30 vteřinové inkubaci smíchali 2 μl suspenze spermií a demembranačního média a 18 μl reaktivačního média (složení: octan draselný – 150 mM, DTT – 1 mM, MgSO_4 – 1 mM, ATP 1mM (bez vanadičnanu), BSA 1 mg.ml^{-1} , Tris-HCl – 20 mM, pH = 8,2). Do reaktivačního média byl přidán chlorid rtuťnatý (HgCl_2) v koncentracích 0,01; 0,1; 1; 10 a 100 mg.l^{-1} .

Demembranované spermie vystavené nízké koncentraci HgCl_2 vykazovaly vysokou úroveň motility, avšak morfologie buněk byla narušena již při 0,4 ppm HgCl_2 ; v proximální části bičíku byly pozorovány zřetelné zlomy, po 1-2 minutách inkubace v RM s obsahem těžkého kovu následovalo scvrknutí celého bičíku vedoucí ke vzniku puchýřků a následně k částečnému narušení bičíku (Abascalet et al., 2007).

Bičík demembranované spermie vykazoval nižší senzitivitu ke rtuti než u nedemembranovaných spermií. Spermie, u kterých neproběhla demembrace, byl v přítomnosti rtuti nepohyblivé, v případě demembranovaných spermií však byla motilita normální (Abascalet et al., 2007).

Vliv těžkých kovů na spermie okouna říčního (*Perca fluviatilis*) pozorovali ve své práci Hatef et al. (2011). I oni použili dvoustupňovou metodu demembrace.

Zjišťovali, jestli HgCl_2 ovlivňuje axonemální strukturu a motilitu spermií aktivovaných v médiu obsahujícím HgCl_2 v koncentracích 62 a 125 μM . Jeden mikrolitr

spermií smíchali se 49 μ l demembranačního roztoku o složení 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 20 mM Tris-HCl a 0,04 % TritonX-100; o pH = 8,2. Poté byl 1 μ l smíchán s reaktivačním médiem o složení 100 mM NaCl, 1 mM Mg-ATP a HgCl₂ (Hatef et al., 2011).

V médiu obsahujícím 125 μ M nedošlo k aktivaci motility, v případě koncentrace 62 μ M byl zaznamenán pokles rychlosti (z $88,1 \pm 3,1$ % na $72,4 \pm 2,3$ %) a motility ($81,4 \pm 1,3$ % na $61,9 \pm 1,2$ %) (Hatef et al., 2011).

3. Materiál a metodika

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

3.1.1. Materiál

Sperma kapra obecného, destilovaná voda, demembranačně-reaktivační médium (pro jednostupňovou metodu), demembranační a reaktivační médium (pro dvoustupňovou metodu), chlorid rtuťnatý (HgCl_2) v koncentracích 0,05, 0,5 a 5 mM (finální koncentrace na sklíčku byla 0,01, 0,1 a 1 mM, v tomto pořadí), pluronic.

Složení použitých médií:

A. Jednostupňová metoda

Složení demembranačně-reaktivačního média: 45 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Tris (pH 8,2), 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 0,01% TritonX-100, (podle Linhart et al., 2003)

B. Dvoustupňová metoda

Složení demembranačního média: 0,15 M octan draselný, 20 mM Tris-HCl (pH = 8,2), 0,5 mM EDTA, 0,1 EGTA, 1 mM DTT; 0,04 % (w/v) TritonX-100

Složení reaktivačního média: 0,15 M octan draselný, 20 mM Tris-HCl (pH = 8,2), 0,5 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 5 % pluronic

(podle Cosson a Gagnon, 1988)

3.1.2. Přístroje

V rámci pokusů byly použity tyto přístroje: barevná kamera Sony SSC 50 AP na mikroskopu BX-41 v konfiguraci pro pozorování v tmavém poli opatřená LED stroboskopickým osvětlením, stroboskopické světlo bylo řízeno signálem z kamery, pro nahrání videosignálu byl použit přístroj Sony DVO 100 doplněný o videotitulovač Hama s jednotkou vnitřního času Elvia.

Dále bylo použito běžného laboratorního náčiní (injekční stříkačka s jehlou, kontejnery na tkáňové kultury, pipety, podložní sklíčka, zkumavky Ependorff, kádinky, laboratorní váhy) a časovače.

3.1.3 Metodika

V rámci pokusu byli použiti mlíčáci kapra obecného, kteří pocházeli z vlastního chovu fakulty rybářství a ochrany vod. Tito mlíčáci byli 24 h před plánovaným

pokusem hypofyzování; dávka kapek hypofýzy pro každého samce byla 1 mg na kilogram živé hmotnosti ryby. Samci byli ve stáří 4 roky, o hmotnosti cca 1 kg. Použito bylo sperma od pěti samců odebrané v den pokusu; teplota vody v den odběru byla 18 °C

Odběr spermatu: Mlíčák byl při vlastním odběru fixován ve vlhké tkanině kvůli minimalizaci pravděpodobnosti vzniku zranění ryby. Odběr se prováděl za pomoci injekční stříkačky či katetru a odběrného kontejneru na tkáňové kultury za současné masáže břišní oblasti. Následně bylo sperma uchováno na ledu při teplotě cca 4 °C do doby provedení vlastního experimentu.

Jako první byla kontrolována motilita spermií. Do 50 µl destilované vody na podložním sklíčku bylo přidáno sperma a následně byla vyšetřena motilita.

Vlastní experiment probíhal následujícím způsobem:

A. Jednostupňová metoda

Na podložní sklíčko bylo kápnuto 50 µl demembranačně-reaktivačního média. Následně byl přidán adenosintrifosfát (ATP) a HgCl₂; postupně v koncentracích 0,05, 0,5 a 5 mM. Jako kontrola byla použita aktivace spermií v destilované vodě. Poté byla studována a zaznamenána motilita spermií. Obraz byl získáván za pomoci výše uvedených zařízení.

Pro analýzu záznamu motility spermií byl použit program PowerDVD verze 4, kterým byly zachycovány jednotlivé snímky; použit byl každý třetí snímek (celkově 5). K vizualizaci pohybu spermií došlo následným složením snímků v jeden pomocí maker pro analýzu obrazu v programu MicroImage verze 4 pro Windows, přičemž nepohyblivé spermie byly vyobrazeny bíle.

Pohybové dráhy spermií byly následně změřeny pomocí manuálního režimu v programu MicroImage. Z naměřených drah a časového odstupu snímků byla následně vypočtena rychlost spermií podle následujícího vzorce:

$$v = (\text{naměřená dráha}/12) \times 25$$

Z poměru pohyblivých spermií vůči nepohyblivým byla určena jejich motilita. Doba, po kterou se spermie pohybovaly, byla měřena stopkami; jako doba pohybu byla

brána doba, během níž bylo možné zaznamenat v zorném poli mikroskopu minimálně jednu pohyblivou spermii.

Výsledná data byla zpracována v programu Statistica verze 12. Pro porovnání dat byl použit Levenův test homogenity rozptylu, následně Kruskal-Walisův test (s hladinou významnosti $p \leq 0,05$).

B. Dvoustupňová metoda

Nejprve byl připraven demembranační roztok smícháním 1000 μ l demembranačního média bez detergentu a 4 μ l TritonuX-100 ve zkumavce typu Ependorff.

Následně bylo z takto připraveného média odebráno 200 μ l do další zkumavky, do které byl přidán 1 μ l spermatu. Suspenze spermatu a DM byla důkladně promísena a ponechána 40 s, během kterých proběhla demembranace.

Na podložním sklíčku byla připravena 50 μ l kapky reaktivačního média s ATP (49 μ l RM + 1 μ l ATP). Do této kapky bylo přeneseno 1 μ l suspenze spermatu s DM. Poté byl po dobu 3 minut nahráván pohyb spermií. Postup byl třikrát opakován. Jako kontrolní skupina byly použity nativní spermie v destilované vodě s HgCl₂ opět ve třech opakováních pro každý vzorek.

Demembranace a následná reaktivace motility spermií s přidáním HgCl₂ byly prováděny obdobným způsobem; 1 μ l HgCl₂ v koncentracích 0,05 mM, 0,5 mM a 5 mM (v tomto pořadí) byl přidáván do kapky RM na podložním sklíčku (finální koncentrace na sklíčku byly 0,01, 0,1 a 1 mM HgCl₂). Celý proces byl zopakován třikrát pro každou koncentraci HgCl₂. Jako kontrolní skupina byly použity demembranované spermie s HgCl₂ opět ve třech opakováních pro každý vzorek.

Následný záznam motility a jeho analýza byly provedeny způsobem popsaným u jednostupňové metody.

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

3.2.1. Materiál

Sperma jesetera malého, destilovaná voda, demembranačně-reaktivační médium, chlorid rtuťnatý (HgCl₂) v koncentracích 0,05, 0,5 a 5 mM (finální koncentrace na sklíčku byly 0,01, 0,1 a 1 mM), pluronic.

Složení použitého média

Složení demembranačně-reaktivačního média: 45 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Tris (pH 8), 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 0,01% Triton X-100)

(podle Linhart et al., 2003)

3.2.2. Přístroje

V experimentu na spermiích jesetera byly použity obdobné přístroje jako v případě pokusu s kaprem obecným.

3.2.3. Metodika

Při pokusu byli použiti mlíčáci jesetera malého pocházející z chovu fakulty rybářství a ochrany vod ve stáří přibližně 10 let o hmotnosti 1-1,5 kg. Tito byli den před plánovaným odběrem spermatu hypofyzováni; dávka činila 4 mg na kilogram živé hmotnosti každého samce. Teplota vody v době odběru byla 15 °C.

Odběr spermatu: Ryba byla při odběru fixována v poloze břichem vzhůru za hlavu a ocas. Sperma bylo odebíráno za použití katetru, suché plastové hadičky o průměru 5 mm a délce více než 20 cm, na jednom z konců šikmo seříznutého. Šikmý konec katetru byl zasunut do močopohlavní bradavky samce, druhý konec pak do nádoby, do které volně odtékalo sperma. To bylo do provedení pokusu uchováno na ledu.

Vlastní experiment pak byl proveden obdobně jako u kapra obecného.

3.3. Demembrance spermií okouna říčního (*Perca fluviatilis*)

3.3.1. Materiál

Sperma okouna říčního, destilovaná voda, imobilizační roztok, demembranační a reaktivační roztok, HgCl₂ v koncentracích 0,05, 0,5 a 5 M (finální koncentrace na sklíčku: 0,01, 0,1 a 1 mM)

Složení použitých médií (podle Hatef et al., 2011):

Imobilizační roztok: 180 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,36 mM CaCl₂, 2,38 mM NaHCO₃, pH = 8,5

Demembranačně-reaktivační médium: 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,2), 0,04 % TritonX-100, 1 mM Mg-ATP, pluronic

3.3.2. Přístroje

Během pokusu byly použity totožné přístroje jako v případě pokusů na kapru obecném a jeseteru malém.

3.3.3. Metodika

K pokusu bylo použito sperma 10 mlíčáků okouna říčního. Samci pocházeli z experimentálního pracoviště FROV JU. Průměrná hmotnost použitých mlíčáků činila 14,5 g. Teplota vody v době odebrání spermatu byla 5 °C.

Sperma bylo odebráno do injekční stříkačky (s imobilizačním roztokem) za současné abdominální masáže. Před odběrem byli samci anestetizováni hřebíčkovým olejem.

Vlastní experiment probíhal obdobným způsobem jako u předchozích experimentů s tím, že byla provedena pouze jednostupňová metoda demembrance.

3.4. Demembrance spermií keříčkovce červenolemého (*Clarias geriapinus*)

3.4.1. Materiál

Sperma keříčkovce červenolemého, destilovaná voda, demembranační médium, reaktivační médium, HgCl₂ (koncentrace byly stejné jako u předchozích tří experimentů, 0,05, 0,5 a 5 mM; (finální koncentrace na skličku: 0,01, 0,1 a 1 mM), pluronic, ATP, TritonX-100

Složení použitých médií:

Složení demembranačního média: 0,15 M octan draselný, 20 mM Tris-HCl (pH = 8,2), 0,5 mM EDTA, 0,1 EGTA, 1 mM DTT; 0,04 % (w/v) TritonX-100

Složení reaktivačního média: 0,15 M octan draselný, 20 mM Tris-HCl (pH = 8,2), 0,5 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 5 % pluronic

(podle Cosson a Gagnon, 1988)

3.4.2. Přístroje

Pro experiment byly použity obdobné přístroje jako v předchozích experimentech.

3.4.3. Metodika

Použiti byli samci keříčkovce červenolemého o průměrné hmotnosti 1,5-2 kg ve stáří 16 měsíců z vlastního chovu FROV JU.

Sperma bylo získáno po zabití ryb preparací testes. Gonády byly následně rozstříhány a ponechány na Petriho misce do vykapání veškerého spermatu. Petriho misky byly do provedení experimentu ponechány na ledu.

Byla provedena dvoustupňová metoda demembrance. Do zkoumavky s 500 μl demembranačního média (DM) s 1 μl 0,04% TritonuX-100 byly přidány 3 μl spermatu. V DM byly spermie ponechány 15 vteřin. Následně byl 1 μl DM se spermatem přidán do 50 μl kapky reaktivačního média s 2 μl ATP a 1 μl pluronicu (použit proti adhezi spermií ke sklíčku). Byla provedena tři opakování.

V případě experimentu s HgCl_2 byl postup obdobný s tím, že do reaktivačního média na podložním sklíčku byl přidáván 1 μl HgCl_2 postupně v koncentracích 0,05 mM, 0,5 mM a 5 mM (finální koncentrace na sklíčku byla 0,01, 0,1 a 1 mM). I zde byla provedena tři opakování.

Jako kontrolní skupiny bylo použito spermatu v 46 mM NaCl, do kterého byl následně přidáván HgCl_2 .

4. Výsledky

4.1. Demembrance spermií kapra obecného (*Cyprinus carpio*)

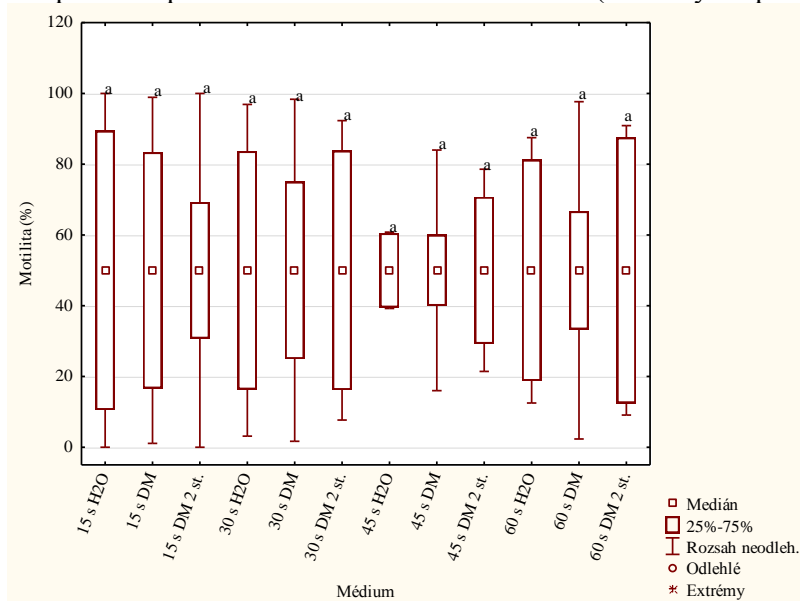
Experiment prokázal možnost demembrance spermií kapra obecného jednostupňovou i dvoustupňovou metodou. Výsledky demembranačního experimentu i jeho následné aplikace shrnují následující tabulky (Tabulka 1. a 2.) a grafy (Graf 1.-10).

Tabulka 1.: Doba pohybu spermií kapra obecného v testovacích médiích

Médium	H ₂ O	DM	DM 2 st.
Doba pohybu	≤ 1,5 min	> 5 min	> 5 min

Naměřené hodnoty motility v použitých testovacích médiích jsou uvedeny v Grafu 1.

Graf 1.: Motilita spermií kapra obecného v testovacích médiích (v % živých spermií)



Na základě statistického porovnání Kruskal-Wallisovým testem ($p=0,05$) nebyl mezi naměřenými hodnotami zaznamenán průkazný rozdíl v žádném z médií, ani v žádném čase.

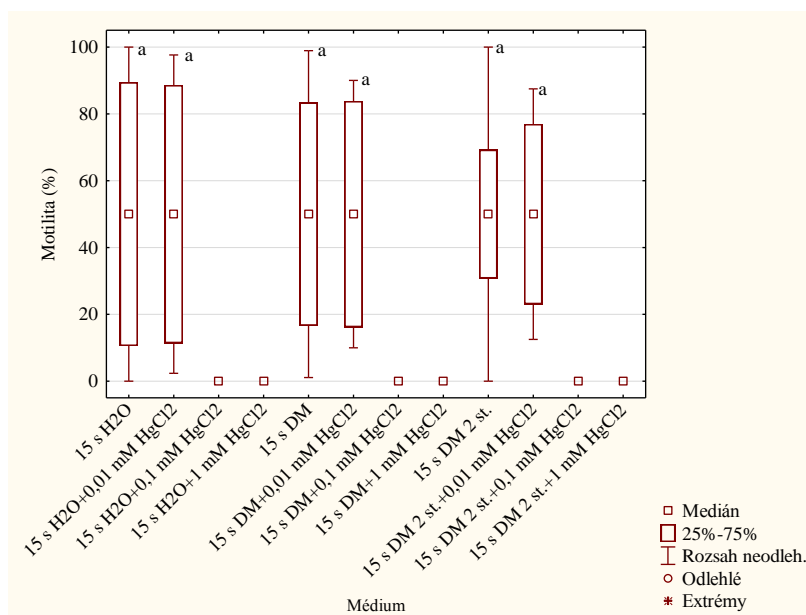
Doby pohybu spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl₂ jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 2.).

Tabulka 2.: Doba pohybu spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl₂

Médium	H ₂ O	H ₂ O + 0,01 mM HgCl ₂	H ₂ O + 0, 1 mM HgCl ₂	H ₂ O + 1 mM HgCl ₂
Doba pohybu	≤ 1,5 min	≤ 1,5 min	0 min	0 min
Médium	DM	DM + 0,01 mM HgCl ₂	DM + 0, 1 mM HgCl ₂	DM + 1 mM HgCl ₂
Doba pohybu	> 5 min	> 5 min	0 min	0 min
Médium	DM 2 st.	DM 2 st. + 0,01 mM HgCl ₂	DM 2 st. + 0, 1 mM HgCl ₂	DM 2 st. + 1 mM HgCl ₂
Doba pohybu	> 5 min	> 5 min	0 min	0 min

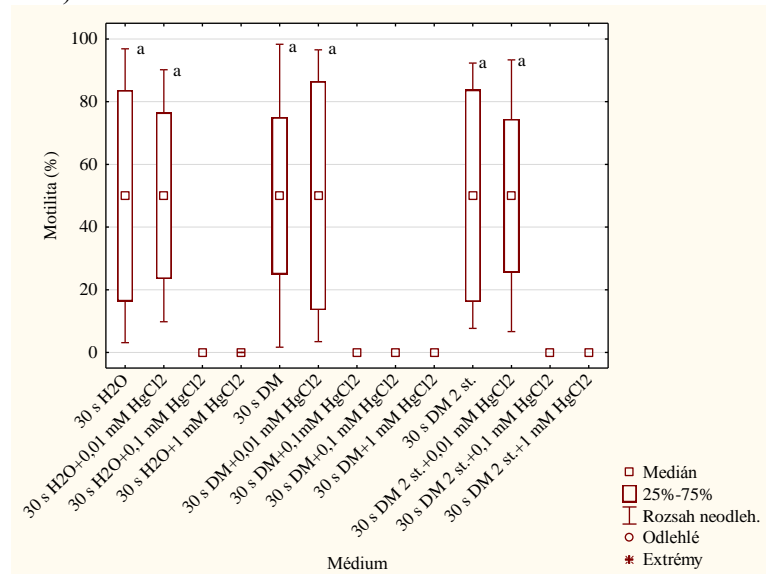
Motilita spermií v testovacích médiích je shrnuta v Grafech 2.-5.

Graf 2.: Motilita spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 15 s (v % živých spermií)



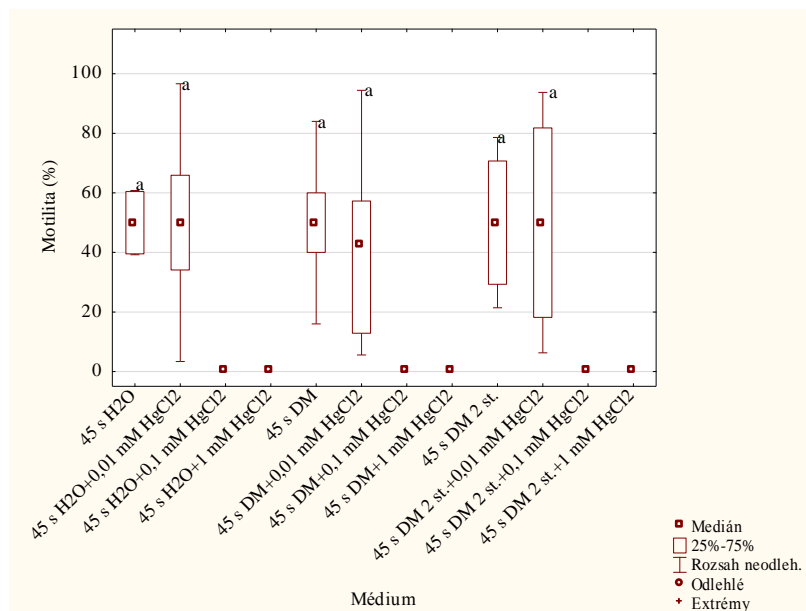
V čase t = 15 s nebyl mezi zkoumanými roztoky, v nichž byla prokázána motilita, zaznamenán statisticky průkazný rozdíl. V roztocích do nichž byl přidán HgCl₂ v koncentracích 0,5 a 5 mM (výsledná koncentrace v kapce média na sklíčku - 0,1 a 1 mM) nebyla motilita zaznamenána.

Graf 3.: Motilita spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 30$ s (v % živých spermií)



V čase $t = 30$ s nebyl mezi zkoumanými roztoky, v nichž byla prokázána motilita, zaznamenán statisticky průkazný rozdíl. V roztocích do nichž byl přidán HgCl_2 v koncentracích 0,5 a 5 mM (výsledná koncentrace v kapce média na sklíčku – 0,1 a 1 mM) nebyla motilita zaznamenána.

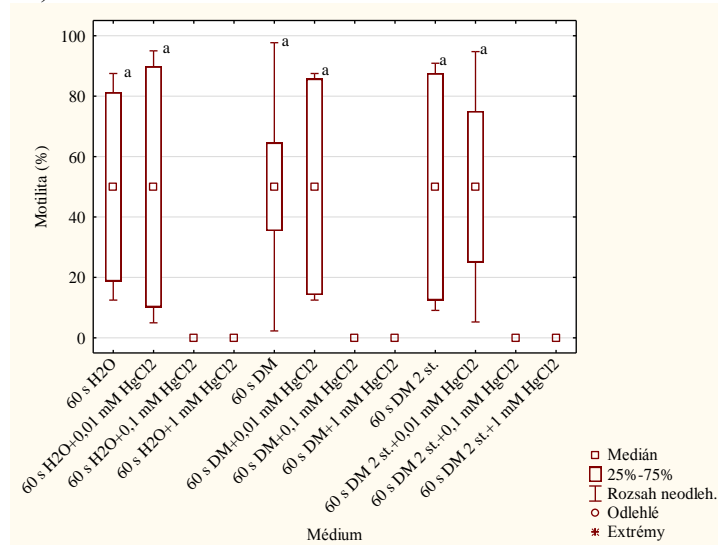
Graf 4.: Motilita spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 45$ s (v % živých spermií)



V čase $t = 45$ s nebyl mezi zkoumanými roztoky, v nichž byla prokázána motilita, zaznamenán statisticky průkazný rozdíl. V roztocích do nichž byl přidán HgCl_2

v koncentracích 0,5 a 5 mM (výsledná koncentrace v kapce média na sklíčku – 0,1 a 1 mM) nebyla motilita zaznamenána.

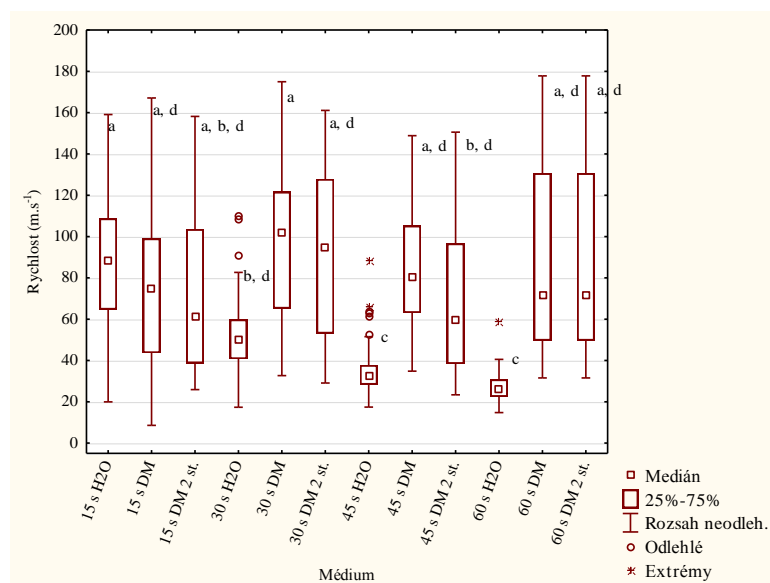
Graf 5.: Motilita spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 60 s (v % živých spermií)



V čase t = 60 s nebyl mezi zkoumanými roztoky, v nichž byla prokázána motilita, zaznamenán statisticky průkazný rozdíl. V roztocích do nichž byl přidán HgCl₂ v koncentracích 0,5 a 5 mM (výsledná koncentrace v kapce média na sklíčku – 0,1 a 1 mM) nebyla motilita zaznamenána.

Naměřené hodnoty rychlosti v použitých testovacích médiích jsou uvedeny v Grafu 6.

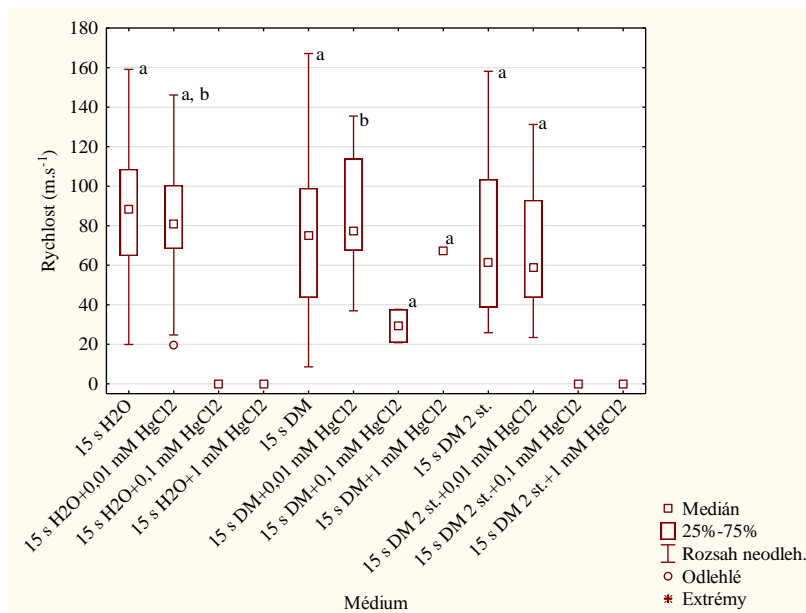
Graf 6.: Rychlost spermií kapra obecného v testovacích médiích (m.s⁻¹)



U naměřených hodnot byly zjištěny statisticky prokazatelné rozdíly zejména mezi skupinami 45 s H₂O a 60 s H₂O, které se shodovaly, a ostatními skupinami.

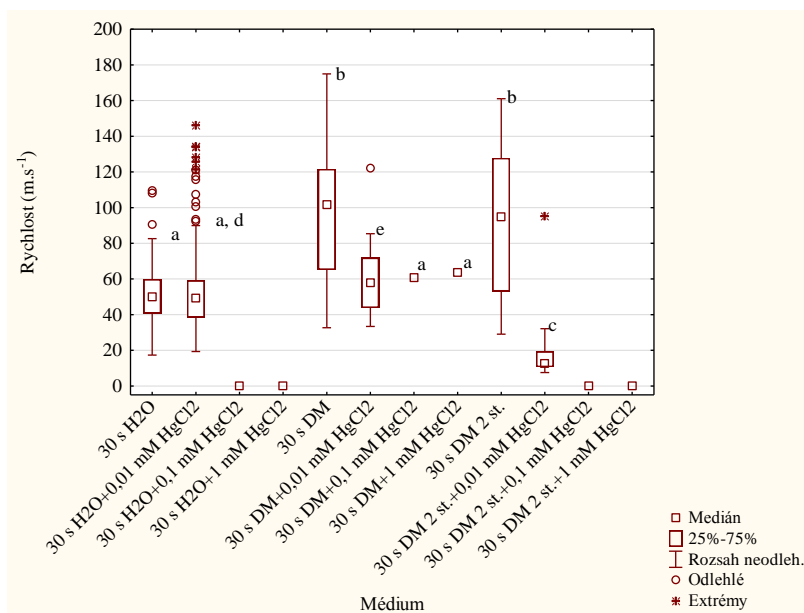
Rychlost spermií kapra obecného v testovacích roztocích s HgCl₂ je shrnuta v Grafech 7.-11.

Graf 7.: Rychlost spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 15 s (m.s⁻¹)



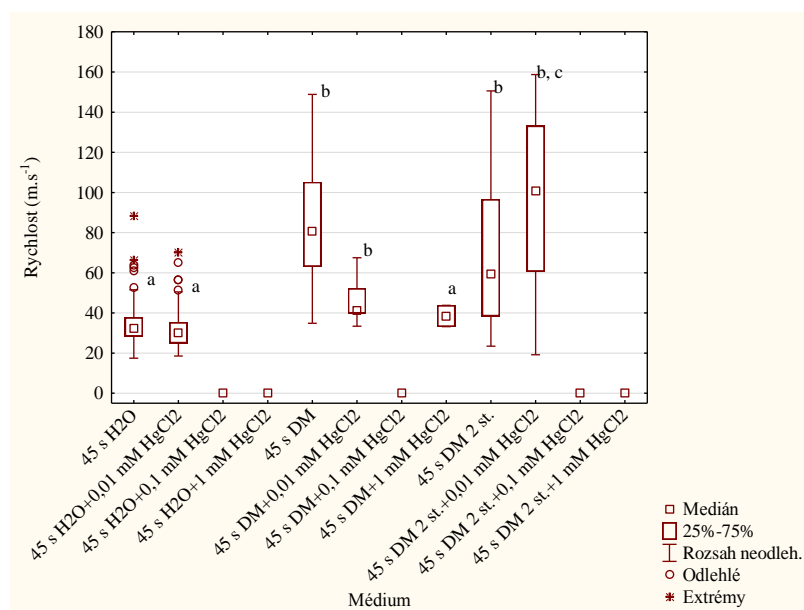
V čase t = 15 s byla nejvýznamnější odlišnost hodnot rychlosti zjištěna mezi skupinami 15 s H₂O + 0,01 mM HgCl₂ a 15 s DM, 15 s DM + 0,01 mM HgCl₂, 15 s DM 2. st., 15 s DM 2. st. + 0,01 mM HgCl₂. V roztocích do nichž byl přidán HgCl₂ v koncentracích 0,5 a 5 mM (výsledná koncentrace v kapce média na sklíčku – 0,1 a 1 mM) nebyla zaznamenána motilita, tedy nebylo možno vypočítat rychlost pohybu.

Graf 8.: Rychlost spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 30 s (m.s⁻¹)



V čase t = 30 s byla nejvýznamnější odlišnost hodnot rychlosti zjištěna v demembranačním médiu s obsahem 0,01 mM HgCl₂. Dále se od sebe lišily skupiny 30 s H₂O + 0,01 mM HgCl₂ a 30 s DM, 30 s DM + 0,01 mM HgCl₂ a 30 s DM 2 st. + 0,01 mM HgCl₂. V roztocích do nichž byl přidán HgCl₂ v koncentracích 0,5 a 5 mM (výsledná koncentrace v kapce média na sklíčku – 0,1 a 1 mM) nebyla zaznamenána motilita, tedy nebylo možno vypočítat rychlost pohybu.

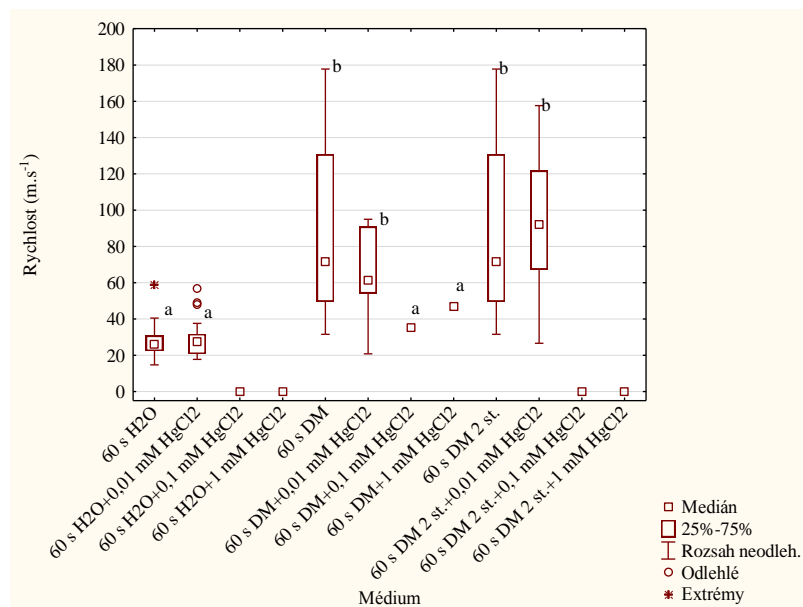
Graf 9.: Rychlost spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 45 s (m.s⁻¹)



V t = 45 s byly nejvýznamnější rozdíly zjištěny mezi vodnými (= kontrolou) a demembranačními médii. Vodná média se od sebe statisticky významně neodlišovala.

Z demembranačních médií byla zaznamenána odlišnost pouze v DM + 0,01 mM HgCl₂. V roztocích do nichž byl přidán HgCl₂ v koncentracích 0,5 a 5 mM (výsledná koncentrace v kapce média na sklíčku – 0,1 a 1 mM) nebyla zaznamenána motilita, tedy nebylo možno vypočítat rychlost pohybu.

Graf 10.: Rychlost spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 60 s (m.s⁻¹)



V čase t = 60 s byl zjištěn rozdíl pouze mezi vodnými (= kontrolou) a demembranačními médii jako skupinami, přičemž hodnoty rychlosti dosahované v H₂O a v H₂O + 0,01 HgCl₂ byly významně nižší než v demembranačních médiích s i bez HgCl₂. V roztocích do nichž byl přidán HgCl₂ v koncentracích 0,5 a 5 mM (výsledná koncentrace v kapce média na sklíčku – 0,1 a 1 mM) nebyla zaznamenána motilita, tedy nebylo možno vypočítat rychlost pohybu.

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

V případě jesetera malého byla uskutečněna jednostupňová demembranace. Výsledky experimentu shrnují následující tabulky (Tabulka 3. a 4.) a grafy (Graf 11.-20.).

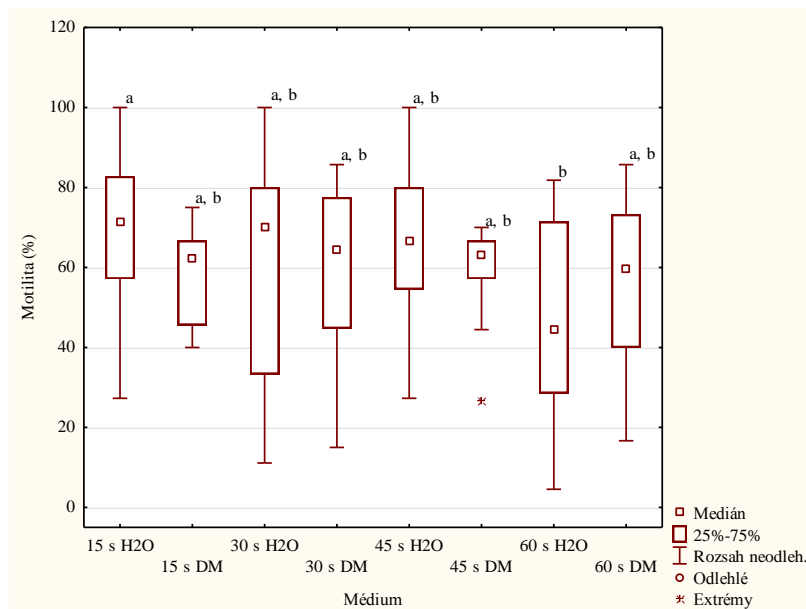
Doba pohybu v použitých médiích je zaznamenána v tabulce (Tabulka 3.).

Tabulka 3.: Doba pohybu spermií jesetera malého v testovacích médiích

Médium	H ₂ O	DM
Doba pohybu	≤ 10 min	> 15 min

Naměřené hodnoty motility spermií jesetera malého v použitých testovacích médiích jsou uvedeny v Grafu 11.

Graf 11.: Motilita spermií jesetera malého v testovacích médiích s HgCl₂ (v % živých spermií)



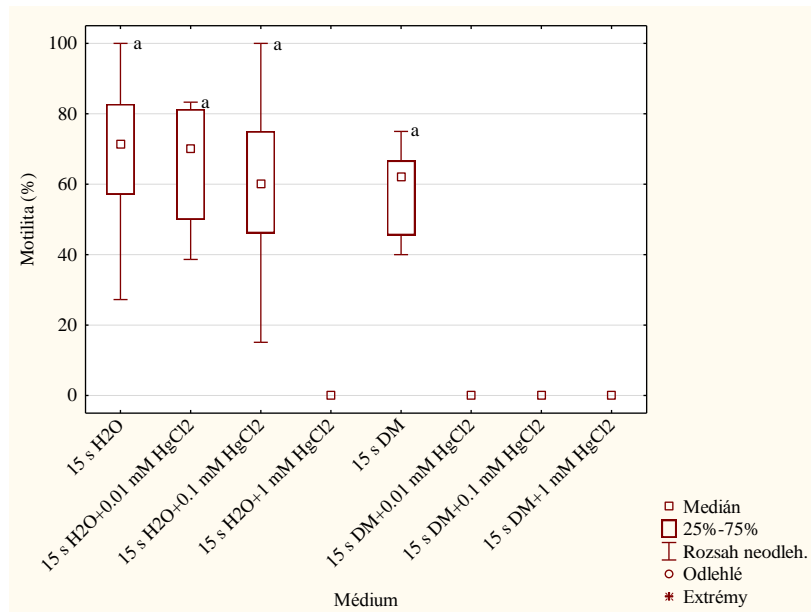
Porovnáním testovaných médií byl zjištěn statisticky prokazatelný rozdíl hodnot motility pouze mezi skupinami 15 s H₂O a 60 s H₂O, ve všech ostatních skupinách nebyl statisticky významný rozdíl zaznamenán.

Tabulka 4.: Doba pohybu spermií jesetera malého v testovacích médiích s HgCl₂

Médium	H ₂ O	H ₂ O + 0,01 HgCl ₂	H ₂ O + 0,1 HgCl ₂	H ₂ O + 1 HgCl ₂
Doba pohybu	≤ 10 min	≤ 10 min	< 10 min	< 5 min
Médium	DM	DM + 0,01 HgCl ₂	DM + 0,1 HgCl ₂	DM + 1 HgCl ₂
Doba pohybu	> 15 min	0 min	0 min	0 min

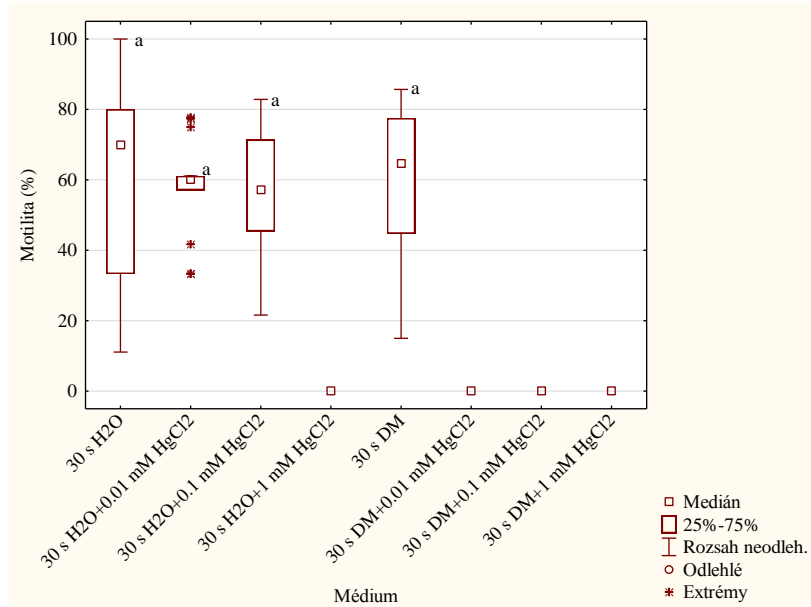
Motilitu spermií jesetera malého v testovacích médiích s HgCl₂ shrnují Grafy 12.-15.

Graf 12.: Motilita spermií jesetera malého v testovacích médiách s HgCl_2 v $t = 15$ s (v % živých spermií)



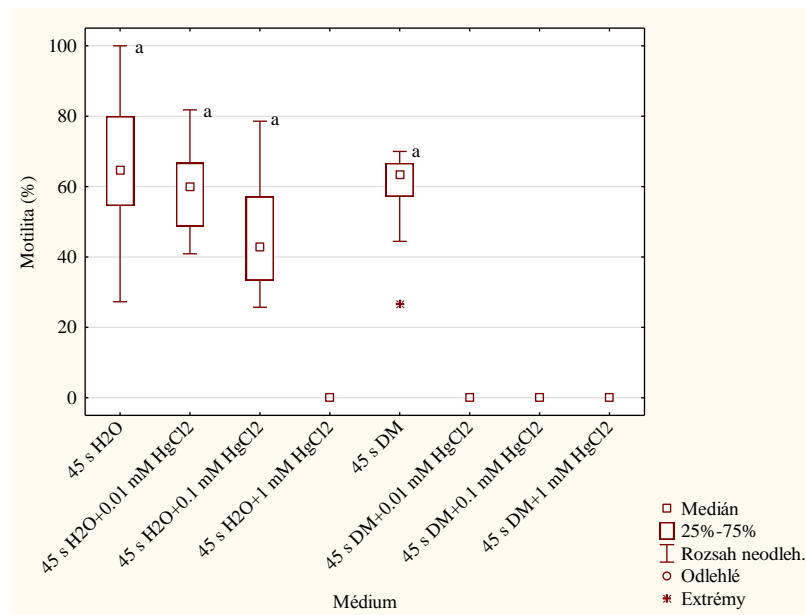
V čase $t = 15$ s nebyl zaznamenaný statisticky významný rozdiel hodnot motility. V demembranačnom médiu obsahujúcom 0,1 a 1 mM HgCl_2 bol zaznamenaný krouživý pohyb spermií.

Graf 13.: Motilita spermií jesetera malého v testovacích médiách s HgCl_2 v $t = 30$ s (v % živých spermií)



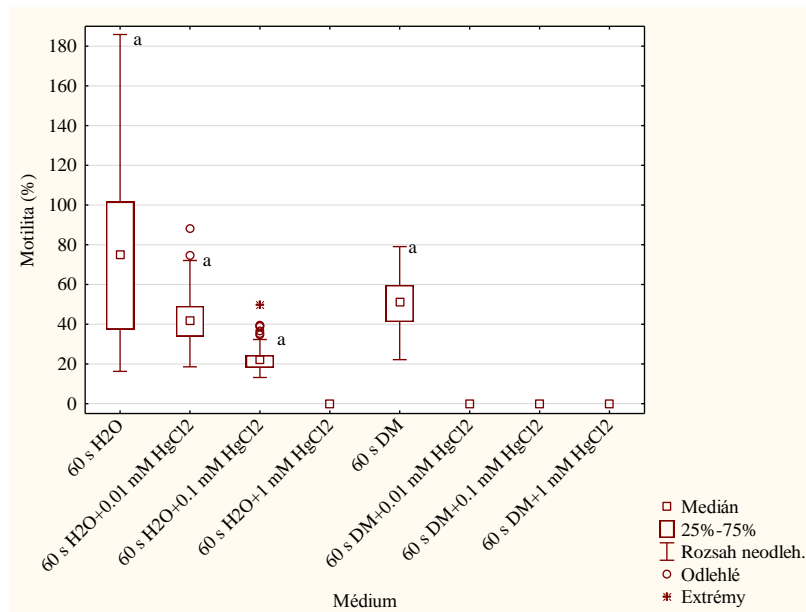
V čase $t = 30$ s nebyl zaznamenaný statisticky významný rozdiel hodnot motility. V demembranačnom médiu obsahujúcom 0,5 a 5 mM HgCl_2 (výsledná koncentrácia v kapke média na sklíčku – 0,1 a 1 mM) bol zaznamenaný krouživý pohyb spermií.

Graf 14.: Motilita spermií jesetera malého v testovacích médiách s HgCl_2 v $t = 45$ s (v % živých spermií)



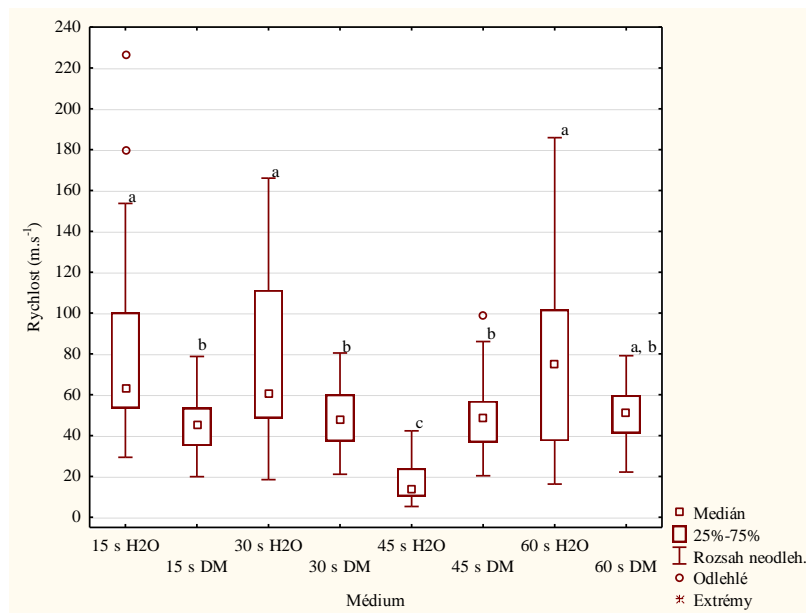
V čase $t = 45$ s nebyl zaznamenaný statisticky významný rozdílný hodnot motility. V demembranačném médiu obsahujícím 0,5 a 5 mM HgCl_2 (výsledná koncentrace v kapce média na sklíčku – 0,1 a 1 mM) byl zaznamenaný krouživý pohyb spermií.

Graf 15.: Motilita spermií jesetera malého v testovacích médiách s HgCl_2 v $t = 60$ s (v % živých spermií)



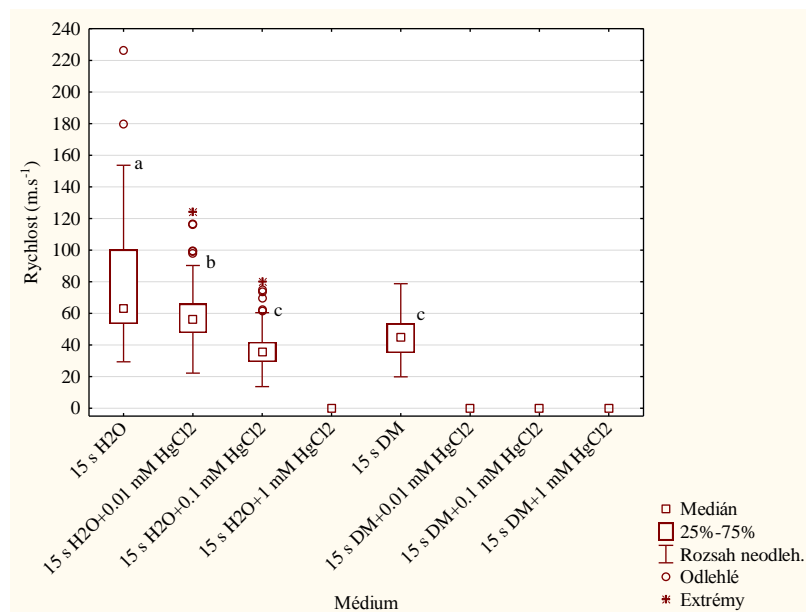
V čase $t = 60$ s nebyl zaznamenaný statisticky významný rozdílný hodnot motility. V demembranačném médiu obsahujícím 0,5 a 5 mM HgCl_2 (výsledná koncentrace v kapce média na sklíčku – 0,1 a 1 mM) byl zaznamenaný krouživý pohyb spermií.

Graf 16.: Rychlost spermií jesetera malého v testovacích médiích ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)



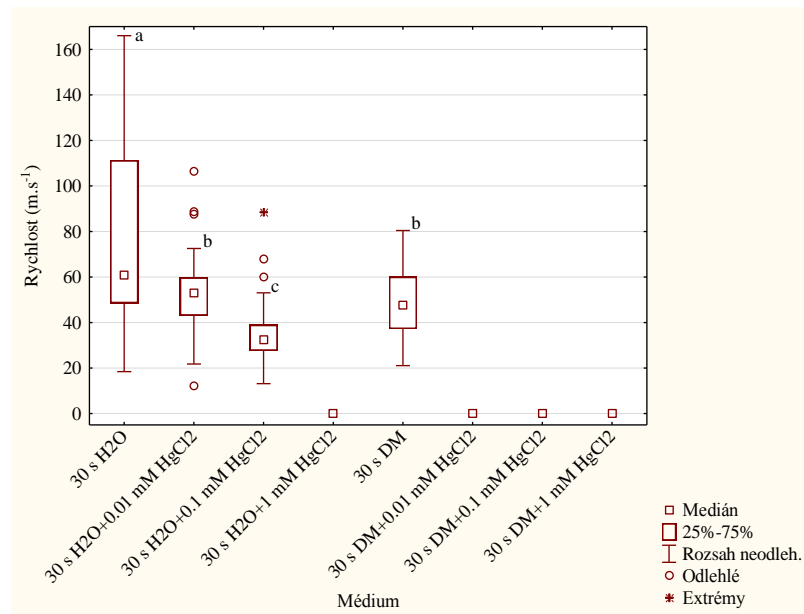
V použitých testovacích médiích byl největší statisticky významný rozdíl zjištěn v čase 45 s v H₂O. Dále se od sebe statisticky lišily skupiny H₂O a DM nezávisle na čase měření.

Graf 17.: Rychlost spermií jesetera malého v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 15 s ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)



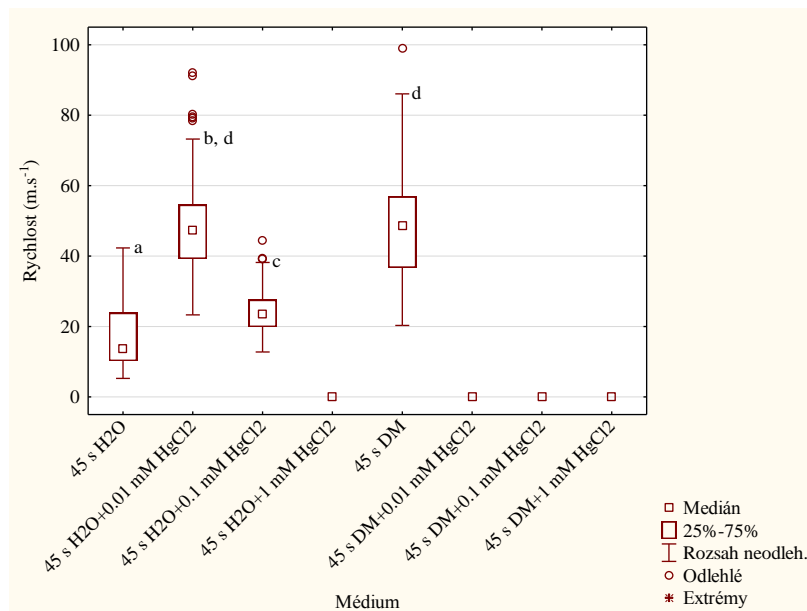
V čase t = 15 s byl zaznamenán statisticky významný rozdíl téměř mezi všemi skupinami. Prokázán nebyl pouze mezi skupinami 15 s H₂O + 0,1 HgCl₂ a 15 s DM. V DM s HgCl₂ nebyla zaznamenána motilita, tedy nebylo možné dopočítat rychlost spermií.

Graf 18.: Rychlost spermií jesetera malého v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 30 s (m.s⁻¹)



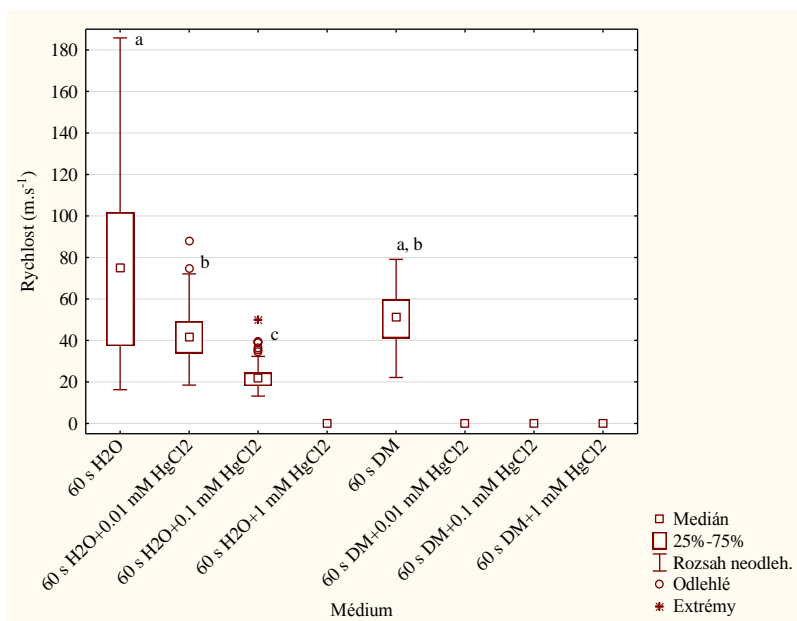
V čase t = 30 s byly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi skupinami 30 s H₂O, 30 s H₂O + 0,01 HgCl₂ a 30 s H₂O + 0,1 HgCl₂. Shoda byla zaznamenána mezi skupinami 30 s H₂O + 0,01 HgCl₂ a 30 s DM. Skupina 30 s H₂O + 1 HgCl₂ se od ostatních statisticky průkazně neodlišovala.

Graf 19.: Rychlost spermií jesetera malého v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 45 s (m.s⁻¹)



V čase t = 45 s byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi všemi skupinami se zaznamenanou motilitou, kromě skupin 45 s H₂O + 0,01 HgCl₂ a 45 s DM, které se mezi sebou shodovaly.

Graf 20.: Rychlost spermií jesetera malého v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 60 s (m.s⁻¹)



V čase t = 60 s byl zjištěn prokazatelný rozdíl mezi skupinami H₂O s a bez HgCl₂. Pouze skupina 60 s DM se statisticky neodlišovala od ostatních, kromě skupiny 60 s H₂O + 0,1 HgCl₂.

4.3. Demembrance spermií okouna říčního (*Perca fluviatilis*)

U okouna říčního byla provedena jednostupňová demembrance. Výsledky experimentu shrnují tabulky Tabulka 5. a 6 a Grafy 21.-30.

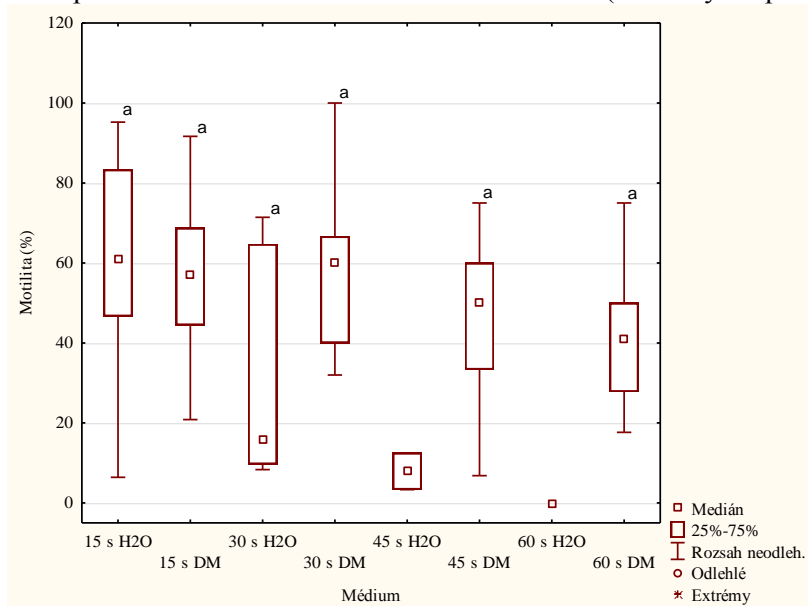
Doba pohybu spermií okouna říčního je zaznamenána v tabulce (Tabulka 5.).

Tabulka 5.: Doba pohybu spermií okouna říčního v testovacích médiích

Médium	H ₂ O	DM
Doba pohybu	≤ 45 s	≤ 7 min

V Grafu 21. jsou zachyceny motility spermií okouna říčního v testovacích médiích (bez HgCl₂).

Graf 21.: Motilita spermií okouna říčního v testovacích médiích (v % živých spermií)



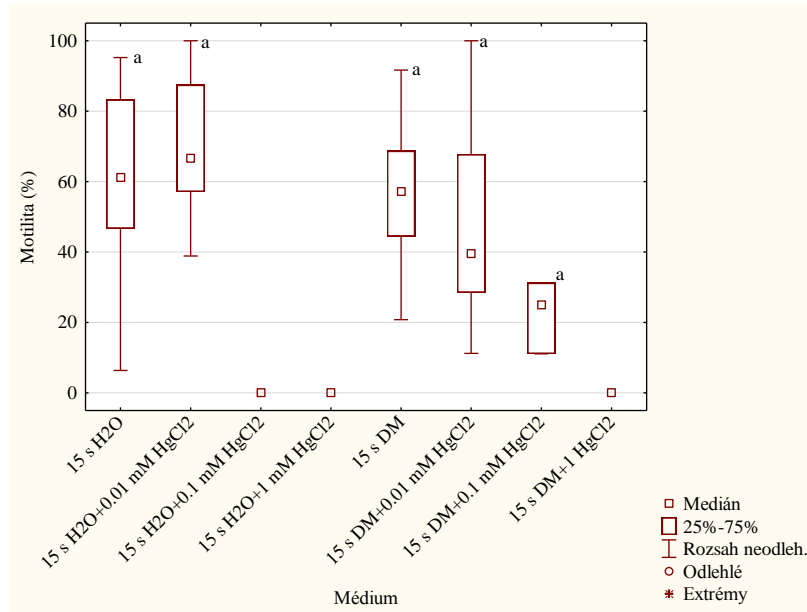
V testovacích médiích nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl motilit.

Motilitu spermií okouna říčního v testovacích médiích s HgCl₂ shrnují Tabulka 6. a Grafy 22.-30.

Tabulka 6.: Doba pohybu spermií okouna říčního v testovacích médiích s obsahem HgCl₂

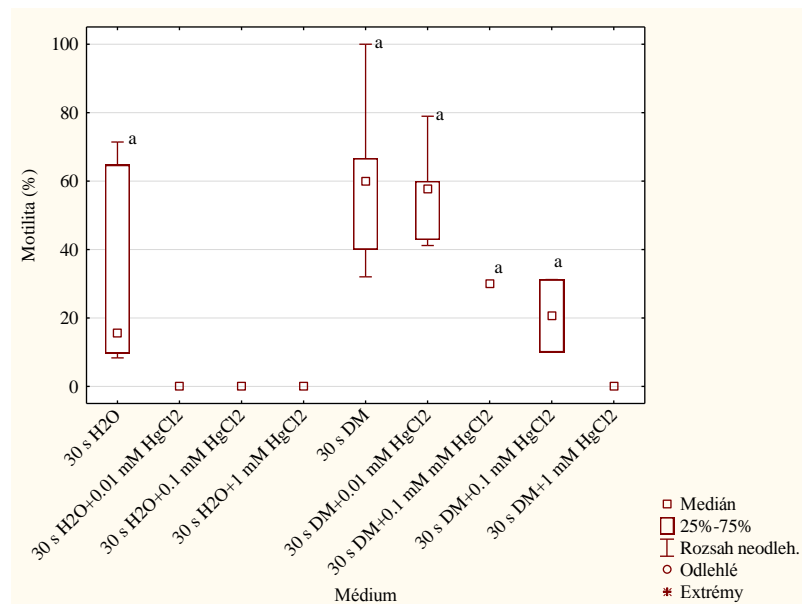
Médium	H ₂ O	H ₂ O + 0,01 mM HgCl ₂	H ₂ O + 0,1 mM HgCl ₂	H ₂ O + 1 mM HgCl ₂
Doba pohybu	≤ 45 s	15 s	0 s	0 s
Médium	DM	DM + 0,01 mM HgCl ₂	DM + 0,1 mM HgCl ₂	DM + 1 mM HgCl ₂
Doba pohybu	≤ 7 min	≤ 7 min	45 s	0 s

Graf 22.: Motilita spermií okouna říčního v testovacích médiích s HgCl₂ v t= 15 s (v % živých spermií)



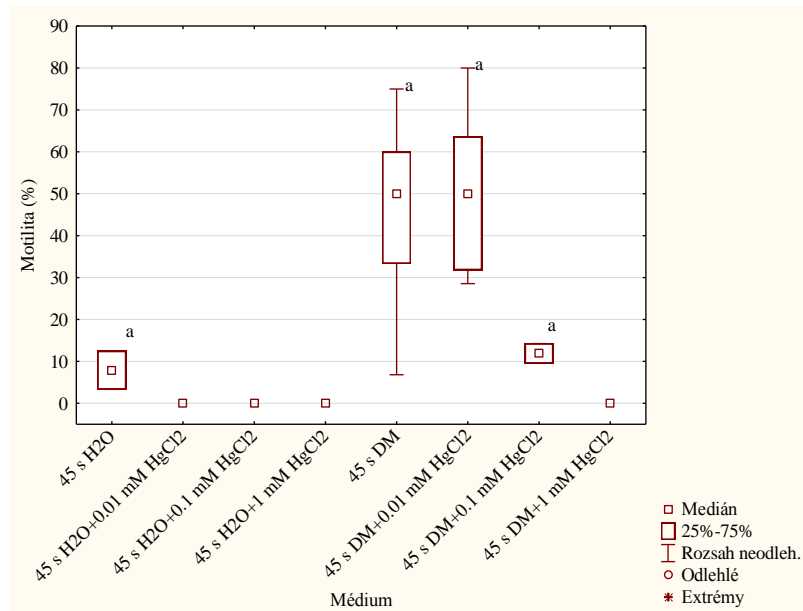
V testovacích médiích v t = 15 s nebyl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl hodnot motility. Ve vodných médiích obsahujícím HgCl₂ v koncentraci 0,1 a 1 mM a v demembranačním médiu obsahujícím HgCl₂ v koncentraci 1mM nebyla zjištěna žádná motilita.

Graf 23.: Motilita spermií okouna říčního v testovacích médiích s HgCl₂ v t= 30 s (v % živých spermií)



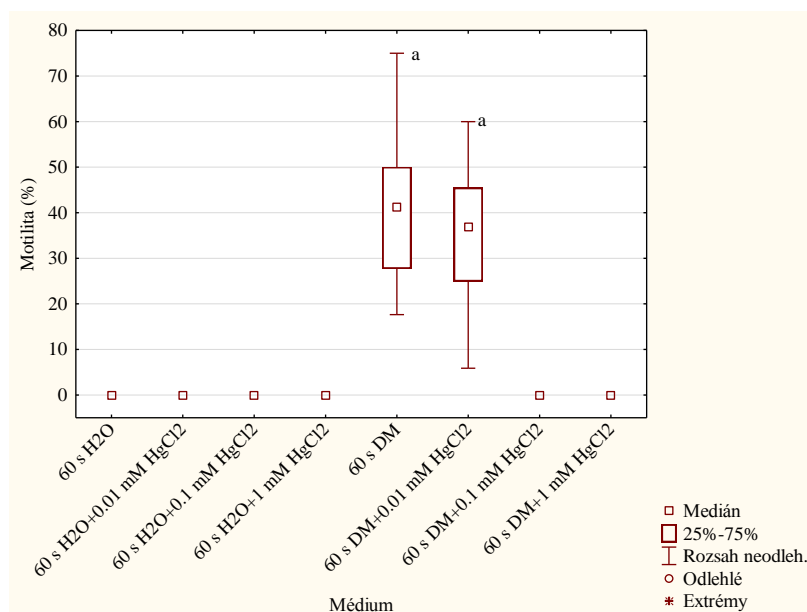
V testovacích médiích v $t = 30$ s nebyl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl hodnot motility. Ve vodných médiích obsahujícím HgCl_2 a v demembranačním médiu obsahujícím HgCl_2 v koncentraci 1mM nebyla zjištěna žádná motilita.

Graf 24.: Motilita spermií okouna říčního v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 45$ s (v % živých spermií)



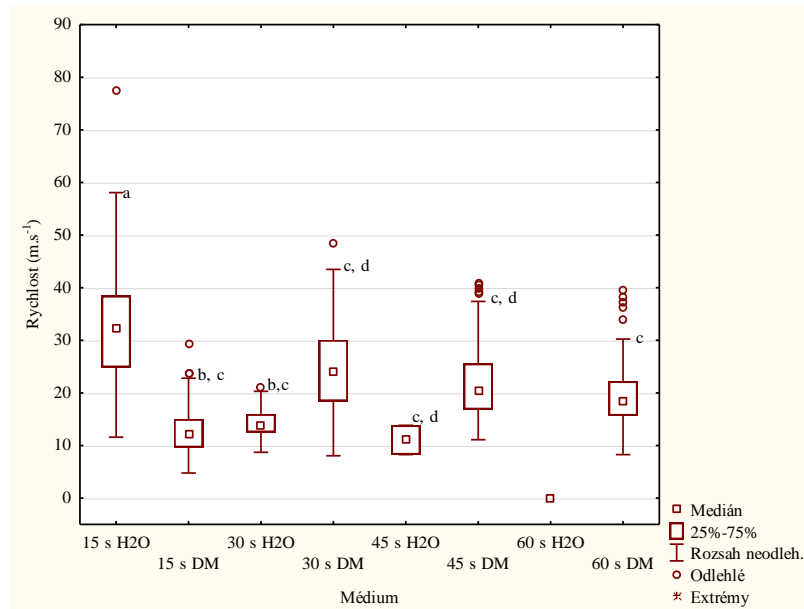
V testovacích médiích v $t = 45$ s nebyl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl hodnot motility. Ve vodných médiích obsahujícím HgCl_2 a v demembranačním médiu obsahujícím HgCl_2 v koncentraci 1mM nebyla zjištěna žádná motilita.

Graf 25.: Motilita spermií okouna říčního v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 60$ s (v % živých spermií)



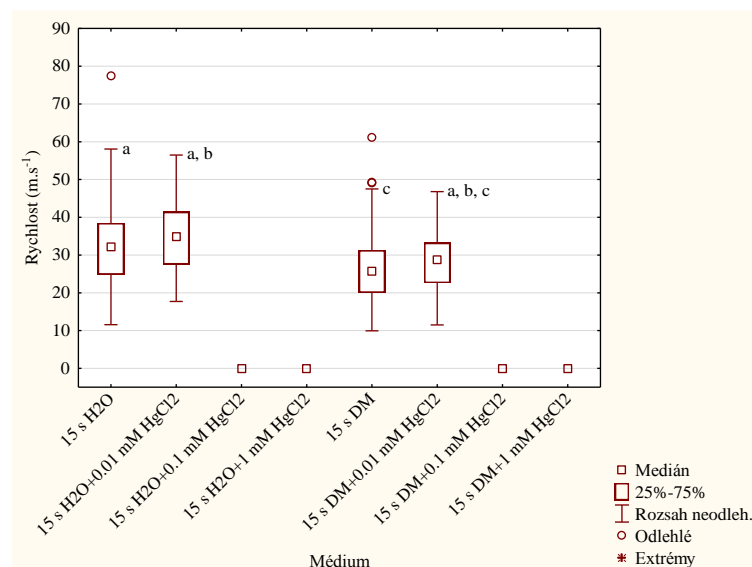
V testovacích médiích v $t = 60$ s nebyl zaznamenaný statisticky průkazný rozdíl hodnot motility. Ve vodném médiu nebyla zjištěna žádná motilita, stejně tak v demembranačním médiu s HgCl_2 v koncentraci 0,1 a 1 mM.

Graf 26.: Rychlost spermií okouna říčního v testovacích médiích ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)



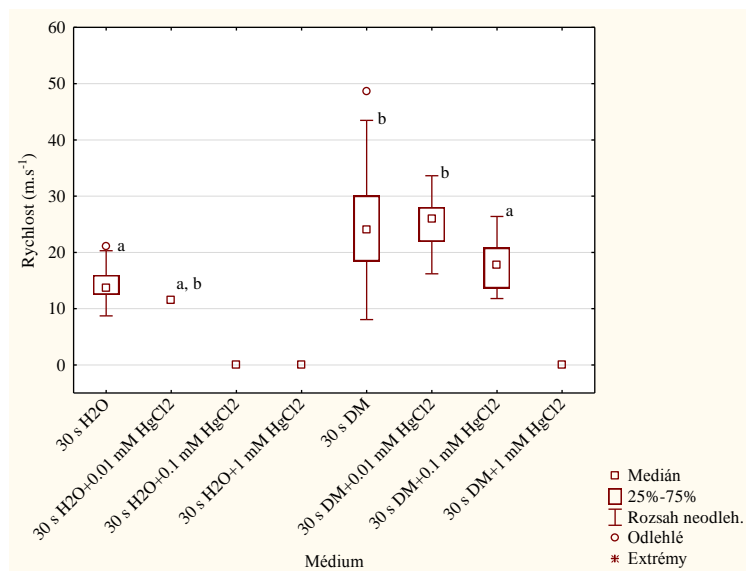
U hodnot rychlosti spermií okouna říčního byl zaznamenaný statisticky průkazný rozdíl mezi skupinou 15 H₂O a ostatními skupinami. Dále byly zjištěny rozdíly mezi skupinami 15 s DM a 30 s DM, 45 s H₂O, 45 s DM a 60 s DM; mezi sebou se lišily i skupiny 30 s DM, 45 s H₂O, 45 s DM a 60 s DM. Ve vodném médiu v $t = 60$ s nebylo možné rychlost dopočítat, neboť zde nebyla zaznamenána motilita.

Graf 27.: Rychlost spermií okouna říčního v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 15$ s ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)



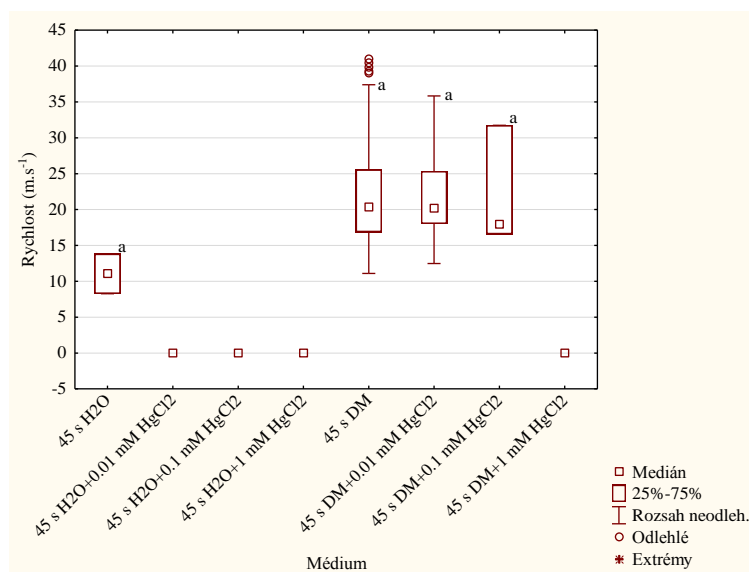
V čase $t = 15$ s byl zjištěn největší statisticky průkazný rozdíl u skupiny 15 s DM. Hodnoty rychlostí ve vodném médiu se neodlišovaly, shoda byla zjištěna i v demembrančním médiu s i bez HgCl_2 .

Graf 28.: Rychlost spermií okouna říčního v testovacích médiích s obsahem HgCl_2 v $t = 30$ s ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)



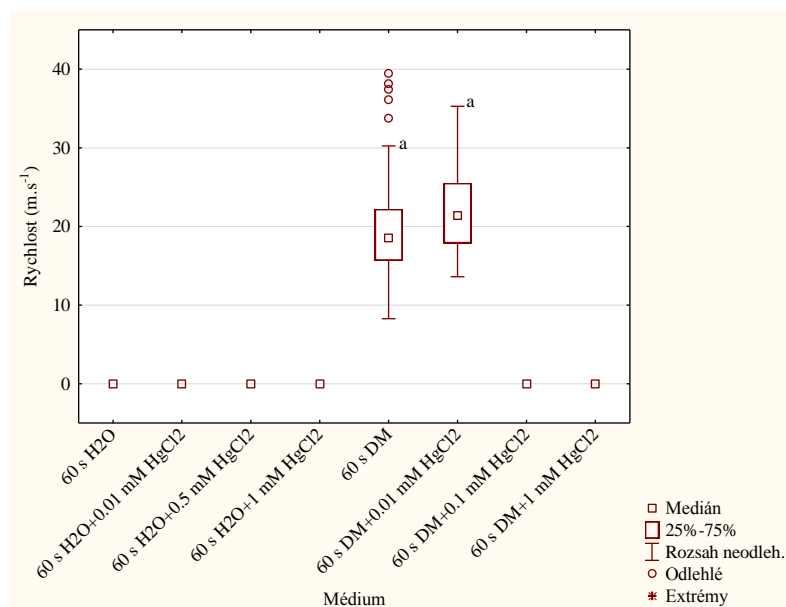
V čase $t = 30$ s byl zjištěn rozdíl mezi skupinami 30 s H₂O a 30 s DM a 30 s DM + 0,01 HgCl_2 (tyto se mezi sebou shodovaly). Shoda byla zaznamenána mezi skupinou 30 s H₂O + 0,01 HgCl_2 a všemi ostatními.

Graf 29.: Rychlost spermií okouna říčního v testovacích médiích s obsahem HgCl_2 v $t = 45$ s ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)



V čase $t = 45$ s nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl zjištěných hodnot.

Graf 30.: Rychlost spermií okouna říčního v testovacích médiích s obsahem HgCl_2 v $t = 60$ s ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)



V čase $t = 60$ s nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl zjištěných hodnot.

4.4. Demembrance spermií keříčkovce červenolemého

U spermií keříčkovce červenolemého byla provedena dvoustupňová demembrance. Na rozdíl od předchozích druhů byla H_2O u kontrolní skupiny nahrazena 46 mM NaCl. Výsledky experimentu jsou zaznamenány v následujících tabulkách (Tabulka 7. a 8.) a grafech (Graf. 31.- 40).

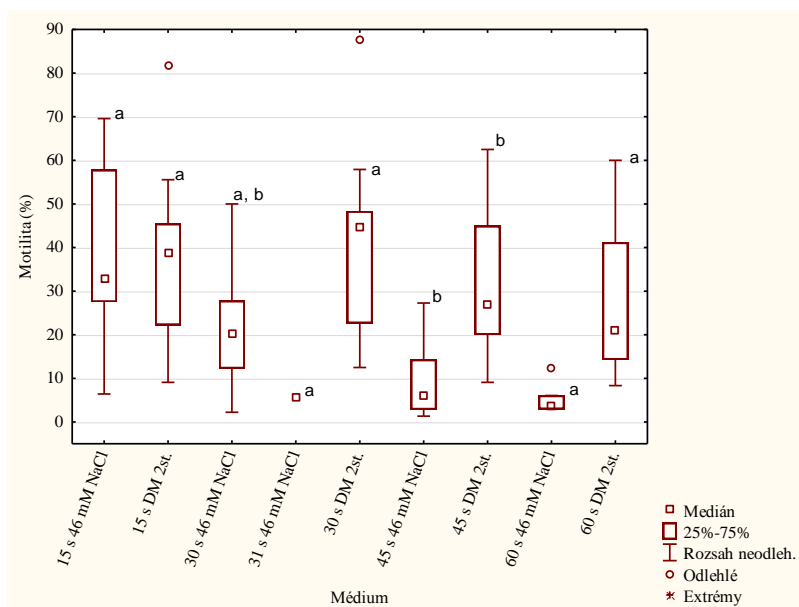
Doba pohybu v použitých médiích je zaznamenána v tabulce (Tabulka 7.).

Tabulka 7.: Doba pohybu spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích

Médium	NaCl	DM 2st.
Doba pohybu	< 4 min	5 min

V Grafu 31. jsou zachyceny motility spermií okouna říčního v testovacích médiích (bez HgCl_2).

Graf 31.: Motilita spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích (v % živých spermií)



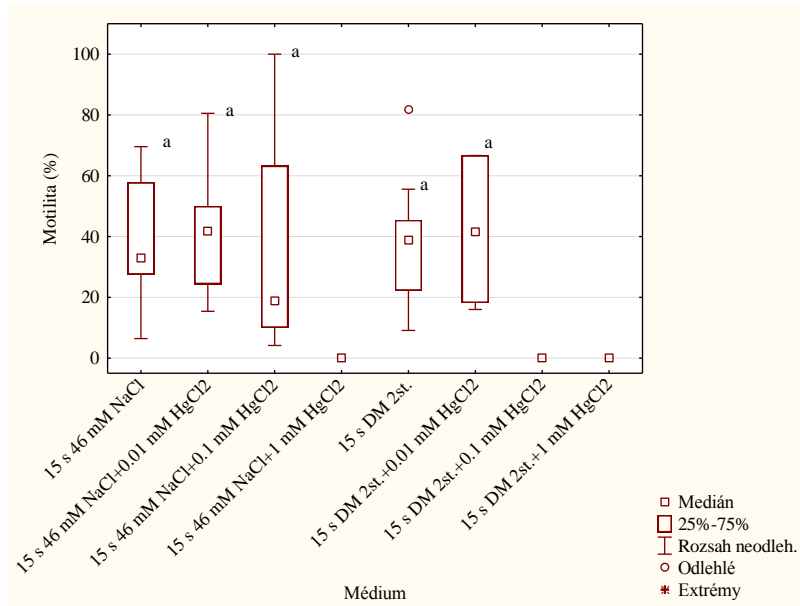
V testovacích médiích byl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl v případě demembranačního média v $t = 45$ s a u 46 mM NaCl ve stejném čase vůči ostatním skupinám, které vzájemný statisticky významný rozdíl nevykazovaly. Médium tvořené 46 mM NaCl se shodovalo se všemi skupinami.

Motilitu spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl_2 shrnují tabulka (Tabulka 8.) a grafy (Graf 32.-35.).

Tabulka 8.: Doba pohybu spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl_2

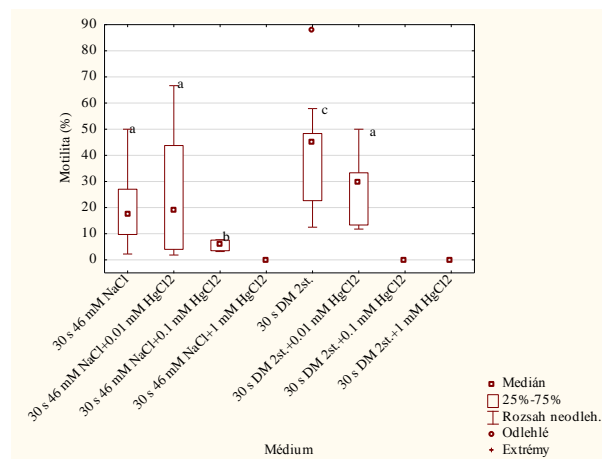
Médium	NaCl	NaCl + 0,01 mM HgCl_2	NaCl + 0,1 mM HgCl_2	NaCl + 1 mM HgCl_2
Doba pohybu	> 4 min	> 4 min	0 min	0 min
Médium	DM 2 st.	DM 2 st. + 0,01 mM HgCl_2	DM 2 st. + 0,1 mM HgCl_2	DM 2 st. + 1 mM HgCl_2
Doba pohybu	5 min	5 min	> 1 min	0 min

Graf 32.: Motilita spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 15 s (v % živých spermií)



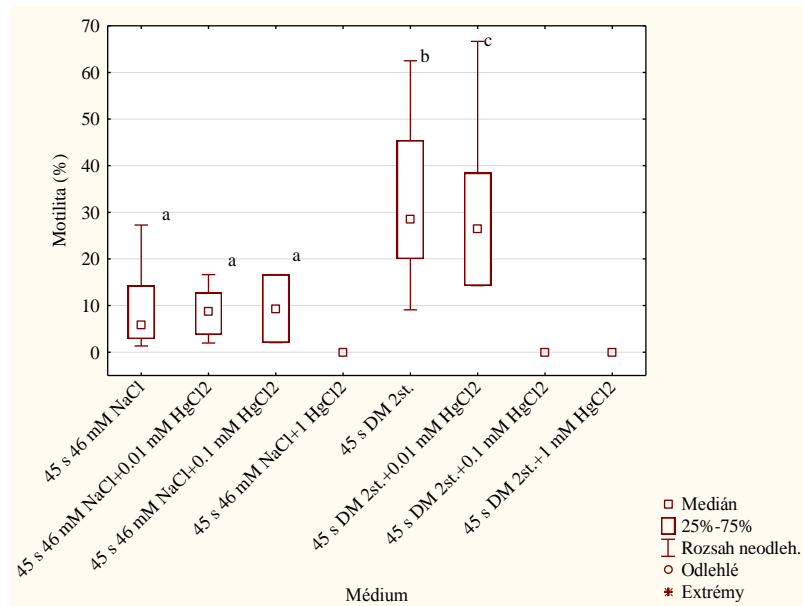
V čase t = 15 s nebyl zjištěn žádný statisticky prokazatelný rozdíl hodnot.

Graf 33.: Motilita spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 30 s (v % živých spermií)



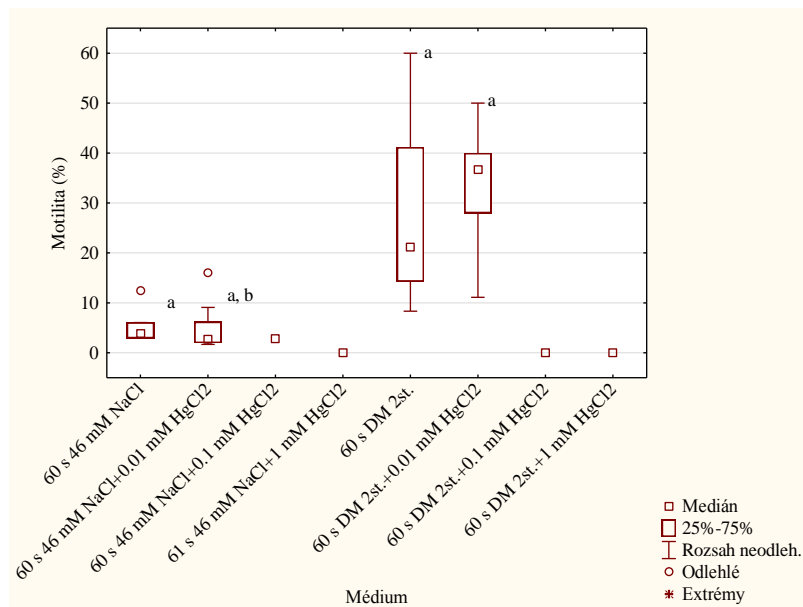
V čase t = 30 s byl zaznamenán statisticky významný rozdíl skupin 46 mM NaCl + 0,1 mM HgCl₂ a DM 2st. vůči všem ostatním.

Graf 34.: Motilita spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 45 s (v % živých spermií)



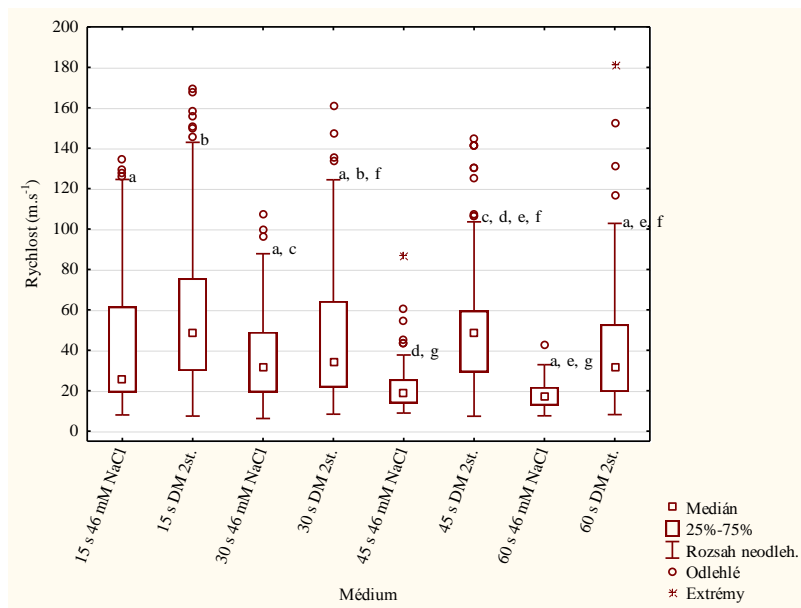
V čase t = 45 s byl zaznamenán statisticky významný rozdíl u skupin 45 s DM 2st. a 45 s DM + 0,01 HgCl₂.

Graf 35.: Motilita spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 60 s (v % živých spermií)



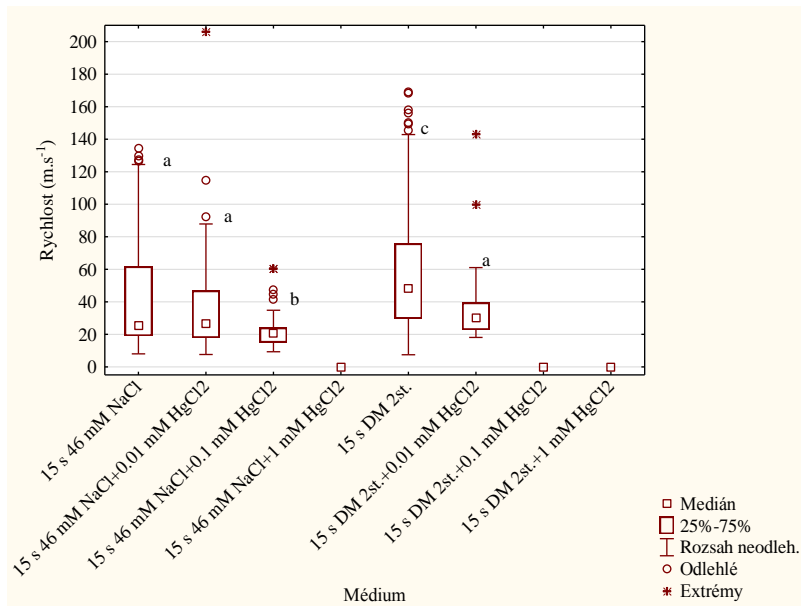
V čase t = 60 s byl zjištěn statisticky významný rozdíl hodnot ve skupině 60 s 46 mM NaCl + 0,01 HgCl₂ vůči demembranačnímu médiu s i bez HgCl₂.

Graf 36.: Rychlost spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)



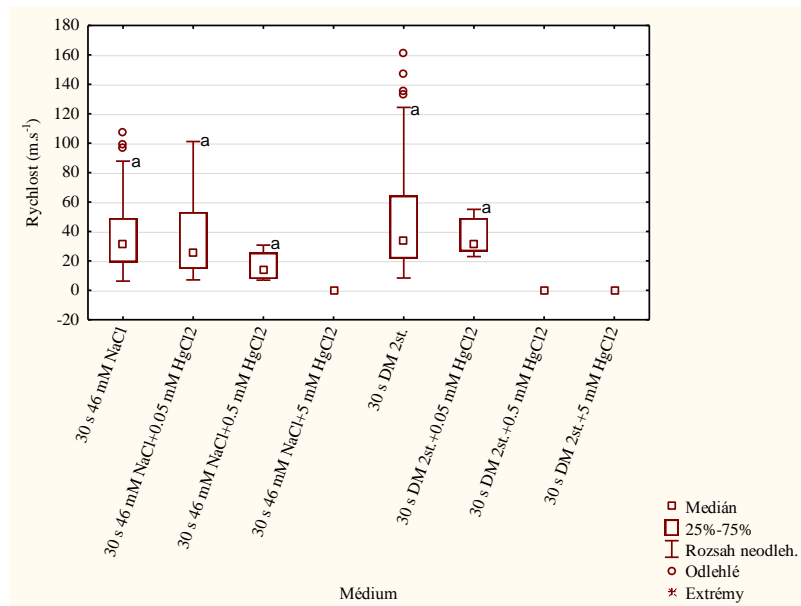
Zjištěné hodnoty rychlosti spermií se statisticky průkazně lišily v čase 15 s. Dále se od ostatních lišily hodnoty naměřené v čase 45 s v 46 mM NaCl.

Graf 37.: Rychlost spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 15$ s ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)



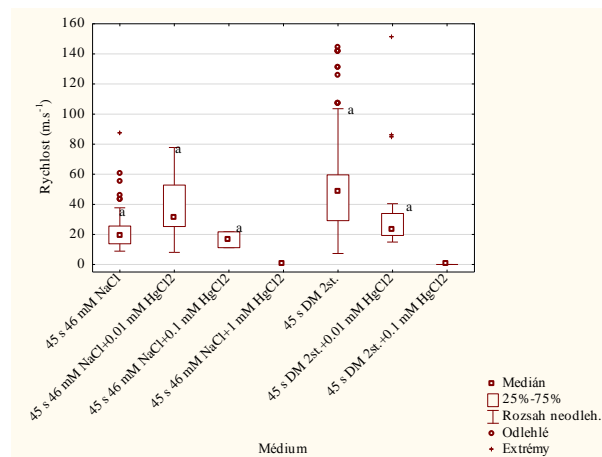
V čase $t = 15$ s byl zjištěn statisticky významný rozdíl u skupin 15 s 46 mM NaCl + 0,1 HgCl_2 a 15 s DM 2 st.

Graf 38.: Rychlost spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 30 s (m.s⁻¹)



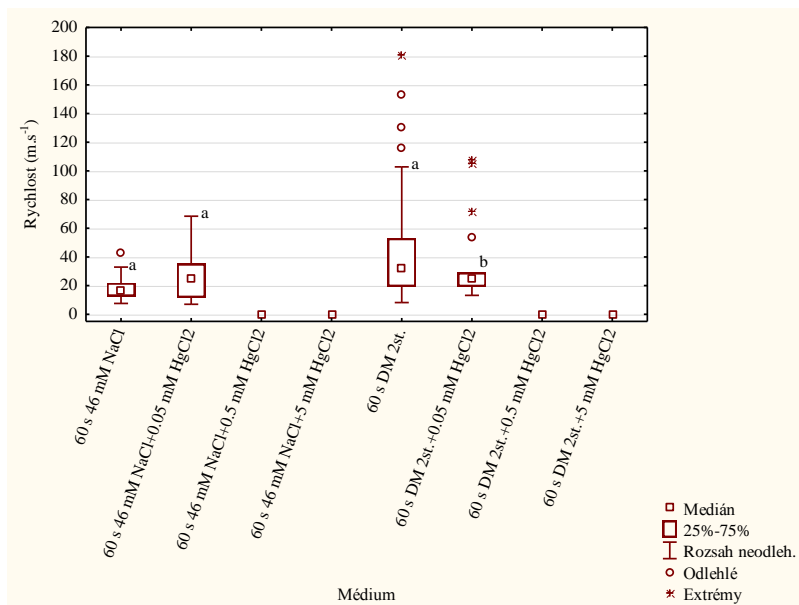
V čase t = 30 s nebyl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl hodnot v žádné skupině.

Graf 39.: Rychlost spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 45 s (m.s⁻¹)



V čase t = 45 s nebyl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl hodnot v žádné skupině.

Graf 40.: Rychlost spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 60 s (m.s⁻¹)



V čase t = 60 s byl statisticky významný rozdíl zaznamenán pouze u skupiny 60 s DM 2st.

5. Diskuze

Demembrance spermií ryb je v laboratorní praxi využitelná například ke studiu působení demembranačního média a látek v něm obsažených (např.: HgCl_2 v použitý v této práci) přímo na vnitřní struktury spermií, neboť eliminuje bariéru mezi vnějším prostředím a intracelulárními strukturami (Blažková, 2012, Linhart et al., 2002 a 2003). Metodu je možné využít i v případě práce s testikulárním spermatem, což dokazuje použití na spermiích keříčkovce červenolemého. Ve všech zmíněných případech působí jako hlavní limitující faktor vyschnutí kapky na podložním sklíčku.

Metody je možné využít i v případě snahy objasnit faktory bránící pohybu spermií ryb (např.: poškození ultrastruktur axonemy, navázání inhibičně působících agens na molekuly dyneinů, poškození mitochondrií). Dále můžeme metody využít v případě studia energetického metabolismu spermií (interakce makroergních látek, studium metabolitů atd.).

Při použití demembrance ke studiu spermií je možné se setkat i s problémy, z nichž některé, které se objevily i při provedení této práce, shrnuje tento odstavec. Prvním z takových problémů je zvolená forma ATP – v této práci i ve většině ostatních studií bylo použito Mg-ATP (např. Cosson a Gagnon, 1988, Linhart et al., 2002 a 2003, Redondo-Muller et al., 1991). Dále se může jednat například o nevhodnou dobu inkubace spermií v demembranačním médiu (viz níže). Příčinou nefunkčnosti postupu může být také kontaminace použitých sloučenin a tím pádem i výsledných roztoků, dále nevhodná koncentrace použitých látek. Při provádění demembrance spermií je nutno také brát v úvahu kvalitu a čistotu podložního sklíčka, neboť nečistoty mohou zavinit nehybnost spermií vlivem jejich přilnutí ke sklíčku.

Jak vyplývá z výše uvedeného, demembrance je mnohostranně využitelná metoda studia spermií. Její použití je však v praxi doprovázeno nepatrným poklesem pohybových parametrů spermií. Dále také nutností uzpůsobení metody danému druhu a situaci, zejména v případě použité koncentrace detergentu (Blažková, 2012 a výsledky této práce) a doby inkubace v demembranačním médiu.

V této práci byla potvrzena možnost demembrance spermií u všech použitých druhů. Navržené metody vycházely ze studia literárních pramenů, přičemž došlo k úpravám zejména v době inkubace spermií v demembranačním médiu a v použité demembranační technice. Například spermie kapra obecného byly v této práci inkubovány v demembranačním médiu po dobu 30 s v souladu postupy uvedenými

literatuře (Poupard et al., 1997), naproti tomu spermie keříčkovce červenolemého byly vystaveny působení média pouze 15 s; u obou druhů byla použita dvoustupňová metoda demembrance.

Pro jednotlivé druhy byly navrženy a vyzkoušeny uvedené postupy. Jak již bylo zmíněno v předchozím odstavci, dvoustupňová metoda demembrance byla vyvinuta pro spermie kapra obecného a keříčkovce červenolemého; pro kapra obecného byl vyzkoušen také jednostupňový postup. Na spermích okouna říčního a jesetera malého byla na rozdíl od výše uvedených druhů použita pouze jednostupňová metoda.

Demembrací spermií kapra obecného se ve své práci zabývali například Linhart et al., (2003) a Redondo-Muller et al. (1991). Pro srovnání výsledků demembrance spermií jesetera malého lze použít studii zabývající se pokusy na spermích veslonosa amerického (Linhart et al., 2002 a 2003).

U okouna říčního a keříčkovce červenolemého dosud neexistují studie, které by se zabývaly vlastní demembrací; pouze Hatef et al. (2011) se ve své studii o spermích okouna říčního zabývali studií vlivu $HgCl_2$ na demembranované okouní spermie. Ve zmiňované studii byla na rozdíl od této práce použita dvoustupňová metoda demembrance. Pro spermie keříčkovce červenolemého byl použit stejný roztok jako pro spermie kapra obecného, neboť se tento postup ukázal jako prakticky aplikovatelný.

U demembranovaných spermií byly v této práci studovány následující pohybové parametry: maximální doba pohybu, procento pohyblivých spermií a rychlost.

Maximální doba pohybu zjištěná v kontrolním vodním médiu u kapra obecného je ve shodě s údaji uváděnými v publikovaných studiích (Linhart et al., 2011, Billard et al., 1995). Podobně je tomu i v případě spermií jesetera malého (Linhart et al., 2010, Alavi et al., 2012) a okouna říčního, u kterého se průměrná doba pohybu shodovala s údaji v literatuře (Linhart et al., 2010, Shaliutina et al., 2012).

U keříčkovce červenolemého bylo nutné zvolit pro kontrolu jiné aktivační médium, neboť v destilované vodě nebyla motilita téměř zaznamatelná (< 15 s), proto byl použit roztok 46 mM NaCl; Rurangwa et al., (1988) použili jako aktivační médium destilovanou vodu; při svém pokusu však používali sklíčko pokryté 1 % polyvinylalkoholem.

Doba pohybu spermií v demembrančním médiu se u kapra obecného shoduje s výsledky studie Linharta et al. (2003) a Redondo-Müllera et al. (1991). U jesetera malého odpovídala výsledkům zaznamenaným u veslonosa amerického (Linhart et al.,

2002). Spermie okouna říčního překračovaly vzhledem k absenci HgCl_2 v demembranačně-reaktivačním médiu časy pohyblivosti zjištěné Hatef et al. (2011).

Procento pohyblivých spermií u kapra obecného se mezi kontrolním a demembranačním médiem statisticky nelišilo, ačkoli počty pohyblivých spermií se mezi jednotlivými pozorováními lišily, a to ve všech časech nezávisle na přidavku HgCl_2 , ačkoli ten způsobil pokles motility. Obdobně pak i u ostatních druhů kromě keříčkovce červenolemého. Možné vysvětlení tohoto jevu může být v obdobném počtu spermií na sklíčku v rámci jednotlivých pozorování. U keříčkovce červenolemého byla zaznamenaná také nevyrovnaná kvalita spermatu získávaného preparací testes po zabití samců.

Procento pohyblivých spermií jesetera malého v demembranačním médiu bylo oproti předchozí bakalářské práci (Blažková, 2012) vyšší, což dokazuje uplatnění metody demembrance v případě nižší kvality spermií.

Procento pohyblivých spermií okouna říčního v destilované vodě dosahovalo podobných hodnot ($\geq 80\%$) jako v práci Krola et al. (2005). V demembranačním médiu s HgCl_2 v koncentraci 0,01 mM, v $\text{H}_2\text{O} + 0,01 \text{HgCl}_2$ zaznamenané v čase 15 s se shodovalo s údaji uvedenými v práci Hatef et al. (2011), kde dosahovalo téměř 100 % hodnot. Hodnoty v H_2O a demembranačním médiu bez přidaného kovu byly vůči výsledkům studie Hatef et al. (2011) nižší cca o 15 %.

Motilitu spermií keříčkovce červenolemého zkoumali Mansour et al. (2002). Zaznamenaná motilita se pohybovala mezi 70-90 %, čemuž odpovídají výsledky dosažené v této práci v 46 mM NaCl. Mansour et al. (2002) také použili jako médium k prodloužení pohyblivosti spermií roztok NaCl. Doba pohyblivosti zaznamenaná v této práci byla delší než 40 s, což je v souladu se závěry uvedené studie. Rurangwa et al. (1988) však ve své práci zaznamenali v médiu bez HgCl_2 motilitu $91,5 \pm 1,5\%$, tedy vyšší než jaká byla zjištěna v této práci.

Dalším zkoumaným parametrem byla rychlost pohybu spermií.

Hodnoty zjištěné u kapra obecného v kontrolním médiu bez HgCl_2 odpovídala údajům v literatuře (Boryshpolets et al., 2013). Boryshpolets et al. (2013) se zabývali také spermii jesetera malého; rychlosti zjištěné v $t = 30$ a 45 s (v H_2O bez HgCl_2) odpovídají závěrům studie, v $t = 15$ s se rychlost liší; oproti výsledkům této studie byly nižší, což lze vysvětlit nižší kvalitou spermatu použitého v této práci.

Rychlost pohybu spermií kapra v demembranačním médiu odpovídá závěrům Linharta et al. (2003) a Pouparda et al. (1997). Rychlost pohybu spermií jesetera malého se lišila od údajů zjištěných u veslonosa amerického (Linhart et al., 2003), lišila se i od výsledků předchozí bakalářské práce (Blažková, 2012), přestože procento pohyblivých spermií v destilované vodě bylo v této práci vyšší. Odpovídala však studii z roku 2002 (Linhart et al., 2002): 80-130 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ naměřených v čase 2 min, kdy došlo k poklesu motility. Sperma použité v této práci však bylo nižší kvality (průměrná motilita $\leq 60\%$).

Hodnoty rychlosti zjištěné v experimentu na spermiích okouna říčního v $t = 15$ s jsou znatelně nižší než ty, které zaznamenal Alavi et al. (2007). Hodnoty v čase 30 s ve vodném médiu se s prací shodují, v čase 45 s jsou pro změnu nižší. Rychlost zjištěná v demembranačním médiu v této práci byla oproti zmiňované studii ve všech sledovaných časech (kromě $t = 15$ s), znatelně vyšší.

Rychlost pohybu spermií keříčkovce červenolemého odpovídá údajům v literatuře (Wagenaar et al., 2012), avšak motilita v 46 mM NaCl bez přidaného HgCl_2 , byla oproti této studii o 10-20 % vyšší; ve studii byly spermie aktivovány vodou z přehrad, ve kterých ryby žily. Obdobně i Mansour et al. (2002) zaznamenal hodnoty rychlosti v rozmezí 120-140 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Tato práce potvrdila také možnost použití demembranace při studiu vlivu HgCl_2 na axonemu prostřednictvím pohybových parametrů demembranovaných spermií. (délky pohybu, % pohyblivých spermií, rychlosti). Na rozdíl studie Hatef et al. (2011) byl v této práci chlorid rtuťnatý aplikován přímo do kapky reaktivačního či demembranačně-reaktivačního média na sklíčku, nedošlo k samostatné inkubaci v médiu s HgCl_2 a následné aplikaci spermií v demembranačním médiu s HgCl_2 do reaktivačního média na sklíčku.

Studiem působení rtuti na spermie kaprovitých ryb se ve své studii zabývali Lahnsteriner et al. (2004), kteří studovali jelce jesena. Obdobně jako v této práci zaznamenali snížení pohybových parametrů. Negativní vliv na parametry spermií kapra obecného prokázali ve své studii i Sarosiek et al. (2009) a Chyb et al. (2001), který zaznamenal hodnoty VCL (*curvilinear velocity*) v rozmezí 40-80 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ v kontrolní skupině a 6,12 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ve skupině s 0,2 mM HgCl_2 . Zjištěná doba pohybu spermií byla 85,26 s, s čímž se shodovala doba zjištěná v této práci v H_2O s koncentrací HgCl_2 0,01 mM.

Působení vlivu iontů rtuti na enzymatický aparát spermií jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*) studovali ve své práci Sarosiek et al. (2007). Aktivita enzymů vlivem rostoucí koncentrace HgCl_2 klesá podobně jako pohybové parametry v této práci. V případě demembranovaných spermií přidávaných do média s HgCl_2 byla v této práci dokonce zaznamenaná stoprocentní inhibice motility. Demembranované spermie jeseterovitých ryb lze tedy pravděpodobně označit za citlivější vůči působení vlivu rtuti.

Oproti demembranovaným spermiím byly nativní spermie jesetera malého pohyblivé i v koncentraci 1 mM HgCl_2 , v čase 15 s bylo procento pohyblivých spermií srovnatelné ve všech testovacích roztocích. Trajektorie spermií byla ve vodě s přidanou koncentrací HgCl_2 0,1 a 1 mM ve 100 % případů krouživá; při použití koncentrace 0,01 mM vykazovaly spermie přibližně v polovině pozorování normální motilitu. Rychlost na rozdíl od motility klesala ve všech případech, kromě koncentrace 0,01 mM HgCl_2 v destilované vodě v čase 30 s, kdy byla zaznamenaná rychlost vyšší než v H_2O bez HgCl_2 .

Vlivem chloridu rtuťnatého na spermie okouna říčního se zabývali Alavi et al. (2011) a Hatef et al. (2011). Podobně jako v této práci se i u Alaviho et al. (2011) procento pohyblivých spermií statisticky významně neodlišovalo napříč použitými koncentracemi HgCl_2 (25, 62 μM HgCl_2 ; koncentrace 125 μM HgCl_2 působila inhibičně).

Nejnižší použitá koncentrace HgCl_2 měla podobně jako v této práci efekt pouze minimální, koncentrace 1 mM měla inhibiční efekt stejně jako nejvyšší koncentrace použité v obou výše uvedených studiích (Alavi et al., 2011 a Hatef et al., 2011). Ve střední koncentraci (0,1 mM HgCl_2) použité v této práci však již k redukci motility došlo. Obdobně jako ve zmiňovaných studiích se procento pohyblivých spermií snižovalo během sledované doby. Chlorid rtuťnatý způsobil také pokles rychlosti spermií okouna ve všech koncentracích i časech (Alavi et al., 2011 a Hatef et al., 2011).

Vliv chloridu rtuťnatého na spermie keříčkovce červenolemého zkoumali Lahnsteiner et al. (2004), Rurangwa et al. (1998) a Kime et al. (1996). Procento pohyblivých spermií keříčkovce červenolemého v médiu s 25 mg.l^{-1} Hg^{2+} (12,5 mM Hg^{2+}) zjistil Lahnsteiner et al. (2004) $24,2 \pm 11,4$ %, která byla vyšší než v případě nejvyšší koncentrace (1 mM HgCl_2) použité v této práci (motilita = 0 %). Rychlost spermií v médiu s obsahem HgCl_2 však byla v této práci srovnatelná se závěry zjištěnými Lahnsteinerem et al. (2004) $61,8 \pm 48,6$ %.

Rurangwa et al. (1998) zjistili pokles motility v médiu s koncentrací Hg^{2+} $0,001 \text{ mg.l}^{-1}$ (5 mM Hg^{2+}) z $35 \text{ } \mu\text{m.s}^{-1}$ v kontrolní skupině na $5 \text{ } \mu\text{m.s}^{-1}$ ve zmíněné koncentraci rtuti. Obdobně i Kime et al. (1996) zjistili v médiu s Hg^{2+} a dalšími těžkými kovy (Zn, Cd) pokles pohybových parametrů spermií keříčkovce červenolemého.

Pokles motility spermií působením těžkých kovů zjistili u pstruha duhového Dietrich et al. (2010). Výše zmíněný hovězí sérový albumin působí spolu s bílkovinou transferinem (obsažená v semenné plasmě) jsou významné kadmium vázající proteiny v krvi pstruha duhového (de Smet et al., 2001 in Dietr. et al, 2010).

Působení rtuti a dalších těžkých kovů na nativní i demembranované spermie morčáka evropského (*Diecentrarchus labrax*) zkoumali Abascal et al. (2006). U nativních spermií zaznamenali hodnoty rychlosti $80\text{-}90 \text{ } \mu\text{m.s}^{-1}$. Po přidání HgCl_2 v koncentracích $>20 \text{ mM}$ byl zjištěn pokles hodnot. Po přidání HgCl_2 k demembranovaným spermiím došlo k inhibici motility.

Abascal et al. (2006) používali ve své práci BSA jako prevenci přilnavosti spermií ke sklíčku. V případě experimentu s HgCl_2 však nebylo možné BSA použít z důvodů jeho interakce se rtuťnatými ionty a tedy hrozícímu zkreslení či úplnému zastření vlivu rtuti; v případě spermií, kde byl použit BSA proti zmíněné adhezi, nebyl zaznamenán pokles motility. Ze stejných důvodů byl v této práci použit proti přilnavosti spermií ke sklíčku pluronic.

6. Závěr

Cílem práce bylo navržení postupu demembrance spermií u čtyř druhů sladkovodních ryb a následné aplikace navržených metod při studiu vlivu chloridu rtuťnatého HgCl_2 přímo na axonemu prostřednictvím pohybových parametrů demembranovaných spermií.

Výsledky práce potvrdily možnost demembrance spermií u všech použitých druhů ryb nezávisle na tom, zda byla použita jedno či dvoustupňová metoda. U všech druhů došlo k prodloužení doby pohybu nad fyziologickou dobu motility spermií, avšak k mírnému poklesu procenta pohyblivých spermií. Rychlost pohybu však byla v pozdějších časech vyšší u demembranovaných než u nativních spermií. Limitujícím faktorem pro použití metody je zde především počáteční kvalita používaného spermatu.

Práce též potvrdila možnost použití demembrance při studiu vlivu těžkých kovů na demembranované spermie. HgCl_2 způsobil pokles hodnot rychlosti u všech druhů ryb, jejichž spermie byly v této práci použity. Demembranované spermie jesetera malého se ukázaly být citlivější vůči HgCl_2 než demembranovaných spermií ostatních testovaných druhů.

Jak vyplývá z výše uvedeného, demembrance je další metoda využitelná při detailním studiu fyziologie spermií ryb. Její použití je však v praxi doprovázeno nepatrným poklesem pohybových parametrů spermií. Dále také nutností uzpůsobení metody danému druhu a situaci, zejména v případě použité koncentrace detergentu a doby inkubace v demembranačním médiu.

7. Přehled použité literatury

Webové stránky:

1. www.sigmaaldrich.com
2. www.thermoscientificbio.com

- Abascal, F. J., Cosson, J., Fauvel, C. 2007. Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. *Journal of Fish Biology*. 70, 2, s. 509-522.
- Alavi, S. M. H., Hatef, A., Pšenička, M., Kašpar, V., Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Cosson, J., Bondarenko, V., Rodina, M., Gela, D., Linhart, O. 2012. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (II) sperm morphology, acrosome reaction, motility and cryopreservation. *Review in Fish Biology and Fisheries*. 22, 4, s. 861-886.
- 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.
- 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
- Badsha, K. S., Goldspink, C. R. 1982. Preliminary observations on the heavy metal content of four species of freshwater fish in NW England. *Journal of Fish Biology*. 21, 3, s. 251-267
- Blažková, J. 2012. Demembrance of sperm of fish as a tool for the study of physiology of activation and movement of sperm of fish. *České Budějovice, Bakalářská práce*. Fakulta rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity. Vedoucí práce Ing. Marek Rodina, Ph.D.
- Boryshpolets, S., Cosson, J., Bondarenko, V., Gillies, E., Rodina, M., Dzyuba, B., Linhart, O. 2013. Different swimming behaviors of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa close to solid and free surfaces. *Theriogenology*. 79, 1, 81–86 s.
- Boryshpolets, S., Kowalski, R. K., Dietrich, G. J., Dzyuba, B., Ciereszko, A. 2013. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology*. 80, 7, s. 758-765.
- Cataudella S., Crosetti, D. 1993. Aquaculture and conservation of genetic diversity, s. 60-73. In R. S. V. Pullin aj. J. L. Maclean (eds.) *Environment and aquaculture in developing countries ICLARM Conf. Proc.* 31, 359 s.
- Cosson, M. P., Gagnon, C. 1988. Protease inhibitor and substrates block motility and microtubule sliding of sea urchin and carp spermatozoa. *Cell motility and the Cytoskeleton*. 10, 518-527

- 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, M. P., Tang, W. Y., Gibbons, I. R. 1983. Modification of flagellar waveform and adenosine triphosphatase activity in reactivated sea-urchin sperm treated with N-ethylmaleimide. *Journal of Cell Biology*. vol. 60, is. MAR, s. 231-249.
- Crowe, J., Bradshaw, T., 2010. *Chemistry for the Biosciences: The essential concepts*; second edition. Oxford. Oxford University Press, 678 s., ISBN 978-0-19-957087-4
- Dehasque, M., 2013. FEAP: European aquaculture production report 2012 – 2013 [online]. [cit. 2014-01-10].
Dostupné z: <http://www.feap.info/Docdownload.asp?ID=B488944A4D07040404D3>
- Dietrich, G. J., Dietrich, M., Kowalski, R. K., Dobosz, S., Karol, H., Demianowicz, W., Glogowski J. 2010. Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success. *Aquatic Toxicology*. 97, 4, s. 277-284.
- Dubský, K., Kouřil, J., V. Šrámek, V., 2003. *Obecné rybářství*. Vydání první. Praha, Informatorium, 312 s. ISBN 80-7333-019-9.
- Gela, D., Rodina, M., Linhart, O. 2008. Řízená reprodukce jeseterů (Acipenser). Edice Metodik, VÚRH Vodňany, 23 s. ISBN 978-80-85887-62-4.
- Ghaffari, M. A., Motlagh, B. 2011. In vitro Effect of Lead, Silver, Tin, Mercury, Indium and Bismuth on Human Sperm Creatine Kinase Activity: a Presumable Mechanism for Men Infertility. *Iranian Biomedical Journal*. 15, 1 & 2, s. 38-43.
- Gibbons, B. H. a I. R. Gibbons. 1983. Flagellar movement and adenosine triphosphatase activity in sea urchin sperm extracted with Triton-X100. *Journal of Cell Science*. 54, 1, s. 231-249.
- Hamáčková, J. Kouřil, J., Masár J. a Turanský, R., 2007. Technologie chovu keříčkovce jihoafrického - sumečka afrického (*Clarias gariepinus*). Edice Metodik, VÚRH JU Vodňany, 19 s. ISBN 978-80-85887-63-1.
- Hatef, A., Alavi, S. H. M., Butts I. A., Policar, T., Linhart, O. 2011. Mechanism of action of mercury on sperm morphology, adenosine triphosphate content and motility in *Perca fluviatilis* (*Percidae, Teleostei*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 30, 4, s. 905-914.
- Hlaváček, J., Pepřík, Š., 2013. UNEP - Znečištění vody. In: [online]. Praha: AMO, [cit. 2014-05-04].
Dostupné z: http://www.studentsummit.cz/data/1384894871518BGR_XIX_UNEP_II.pdf

- Chyb, J., Sokolowska-Mikolajczyk, M., Kime, D. E., Socha, M., Epler, P. 2001. The influence of mercury on computer analyzed sperm motility of common carp, *Cyprinus carpio* L., in vitro. *Archives of Polish Fisheries.*, 9, 1, s. 51-60.
- Ignotz, G. G., Suarez, S. S. 2005. Calcium/calmodulin and calmodulin kinase II stimulate hyperactivation in demembrated bovine sperm. *Biology of Reproduction.* 73, 3, s. 519-526.
- Kime, D. E. 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. In *Fish Biology and Fisheries.* 5, 1, s. 52-95.
- Kime, D. E., Ebrahimi, M., Nysten, K., Roelants, I., Rurangwa, E., Moore H. D. M., Ollevier, F. 1996. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effect of pollution on sperm quality of fish; application to the effect of heavy metals. *Aquatic toxicology.* 36, 3-4, s. 223-237.
- Kouřil, J., Drozd, B., Prokešová, M., Stejskal, V. 2013. Intenzivní chov keříčkovce jihoafrického - sumečka afrického (*Clarias gariepinus*). Edice Metodik, České Budějovice, FROV JU Vodňany, 60 s. ISBN 978-80-87437-79-7.
- Kouřil, J., Podhorec, P., Stejskal, V., Policar, T., Křišťan, J., Drozd, B. 2011. Optimalizace metod hormonálně indukované ovulace při řízené reprodukci vybraných hospodářsky významných teplomilných druhů ryb. Edice Metodik, České Budějovice, FROV JU Vodňany, 34 s. ISBN 978-80-87437-38-4.
- Krol, J., Glogowski, J., Demska-Zakes, K., Hliwa, P. 2006. Quality of semen and histological analysis of testes in Eurasian perch *Perca fluviatilis* L., during a spawning period. *Czech Journal of Animal Science.* 51, 5, s. 220-226.
- Lahnsteiner, F., Mansour, N., Berger, B. 2004. The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology.* 65, 5, s. 1283-1297
- 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.
- 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.* 24, 5, 713-719 s.
- Linhart, O., Dzyuba, B., Boryshpolets, S., Rodina, M. 2010. Zmrazování spermatu jesetera malého (*Acipenser ruthenus*). Edice Metodik, České Budějovice, FROV JU Vodňany, 21 s. ISBN 978-80-87437-03-2.

- Linhart, O., Rodina, M., Boryshpolets, S. 2010. Zmrazování spermatu jesetera malého (*Acipenser ruthenus*). Edice Metodik, České Budějovice, FROV JU Vodňany, 21 s. ISBN 978-80-87437-03-2.
- Linhart, O., Rodina, M., Boryshpolets, S. 2011. Hodnocení čerstvého spermatu ryb. Edice Metodik, České Budějovice, FROV JU Vodňany, 26 s. ISBN 978-80-87437-32-2.
- Linhart O., Šlechta V., Slavík T., 1991. Fish sperm composition and biochemistry. Bulletin of Institut of Zoology. Academia Sinica, monograph. 16, 288-311 s.
- Mansour, N., Lahnsteiner, F., Patzner, R. A. 2002. The spermatozoon of the African catfish: fine structure, motility, viability and its behaviour in seminal vesicle secretion. Journal of Fish Biology. 60, 3, s. 545-560.
- Massanyi, L., 1991. Funkčná morfológia spermie. Bratislava, Veda, 196 s. ISBN 80-224-0149-8.
- Massar, B., Dey, S., Dutta, K., 2011. An electron microscopic analysis on the ultra structural abnormalities in sperm of the common carp *Cyprinus carpio* L. inhabiting a polluted lake, Umiam (Meghalaya, India). Microscopy Research and Technique. 74, 11, s. 998-1005.
- McIntyre, J. D. 1973. Toxicity of methyl mercury for steelhead trout sperm. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 9, 2, s. 98-99.
- Polícar, T., Alavi, S. M. H., Bláha, M., Stejskal, V., Kouřil, J. 2009. Technologie intenzivního chovu okouna říčního (*Perca fluviatilis* L.). Vodňany: VÚRH JU Vodňany, 51 s. ISBN 978-80-85887-89-1.
- 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., Rodina, M., Flajšhans, M., Kašpar, V., Linhart, O., 2009. Structural abnormalities of common carp *Cyprinus carpio* spermatozoa. Fish Physiology and Biochemistry. 35, 4, s. 591-597.
- Redondo-Muller, C., Cosson, M. P., Cosson, J., Billard, R., 2003. In vitro maturation of the potential for movement of carp spermatozoa molecular reproduction and development. Molecular Reproduction and Development. 29, 3, 259-270 s.
- Rurangwa, E., Roelants, I., Huyskens, G., Ebrahimi, M., Kime D. E., Ollevier F. 1998. The minimum effective spermatozoa : egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. Journal of Fish Biology. 53, 2, s. 402-413.
- Sarosiek, B., Pietruszewicz, M., Radziwoniuk, J., Glogowski, J. 2009. The effect of copper, zinc, mercury and cadmium on some sperm enzyme activities in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). Reproductive Biology. 9, 3, s. 295-301.

- Steyn, G. J., Van Vuren, J.H.J. 1987. Some physical properties of the semen from artificially induced sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 86, 2, s. 315-317.
- Urbanyi, B., Horvath, A., Varga, Z., Horvath, L., Magyary, I., Radics F. 1999. Effect of extenders on sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Aquaculture Research*. 30, 2, s. 145-151.
- Vacík, J., Barthová, J., Pacák, J., Strauch, B., Svobodová, M., Zemánek, F., 1990. *Přehled středoškolské chemie*. Praha, SPN, 368 s., ISBN 80-04-22463-6
- Van Look, K. J. W., Kime, D. E. 2003. Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm. *Journal of Fish Biology.*, 63, 4, s. 1020–1033
- Vodrážka, Z., 2002. *Biochemie*. Praha, Academia, 508 s., ISBN 80-200-0600-1 : 450.00
- 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

- Pšenička, M., Rodina, M., J. Nebesářová, J., Linhart, O., 2006. Ultrastructure of spermatozoa of tench *Tinca tinca* observed by means of scanning and transmission electron microscopy. *Theriogenology*. 66, 5, s. 1355-1363.

9. Seznam použitých obrázků, tabulek a grafů

Seznam použitých obrázků

Obr. 1.: Spermie lína obecného (*Tinca tinca*)

Seznam použitých tabulek

Tabulka 1.: Doba pohybu spermií kapra obecného v testovacích médiích

Tabulka 2.: Doba pohybu spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl_2

Tabulka 3.: Doba pohybu spermií jesetera malého v testovacích médiích

Tabulka 4.: Doba pohybu spermií jesetera malého v testovacích médiích s HgCl_2

Tabulka 5.: Doba pohybu spermií okouna říčního v testovacích médiích

Tabulka 6.: Doba pohybu spermií okouna říčního v testovacích médiích s obsahem HgCl_2

Tabulka 7.: Doba pohybu spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích

Tabulka 8.: Doba pohybu spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl_2

Seznam použitých grafů

Graf 1.: Motilita spermií kapra obecného v testovacích médiích (v % živých spermií)

Graf 2.: Motilita spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 15$ s
(v % živých spermií)

Graf 3.: Motilita spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 30$ s
(v % živých spermií)

Graf 4.: Motilita spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 45$ s
(v % živých spermií)

Graf 5.: Motilita spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 60$ s
(v % živých spermií)

Graf 6.: Rychlost spermií kapra obecného v testovacích médiích ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)

Graf 7.: Rychlost spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 15$ s ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)

Graf 8.: Rychlost spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 30$ s ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)

Graf 9.: Rychlost spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 45$ s ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)

Graf 10.: Rychlost spermií kapra obecného v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 60$ s ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)

Graf 11.: Motilita spermií jesetera malého v testovacích médiích s HgCl_2 (v % živých spermií)

Graf 12.: Motilita spermií jesetera malého v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 15$ s
(v % živých spermií)

Graf 13.: Motilita spermií jesetera malého v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 30$ s
(v % živých spermií)

- Graf 14.: Motilita spermií jesetera malého v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 45$ s
(v % živých spermií)
- Graf 15.: Motilita spermií jesetera malého v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 60$ s
(v % živých spermií)
- Graf 16.: Rychlost spermií jesetera malého v testovacích médiích (m.s^{-1})
- Graf 17.: Rychlost spermií jesetera malého v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 15$ s (m.s^{-1})
- Graf 18.: Rychlost spermií jesetera malého v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 30$ s (m.s^{-1})
- Graf 19.: Rychlost spermií jesetera malého v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 45$ s (m.s^{-1})
- Graf 20.: Rychlost spermií jesetera malého v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 60$ s (m.s^{-1})
- Graf 21.: Motilita spermií okouna říčního v testovacích médiích (v % živých spermií)
- Graf 22.: Motilita spermií okouna říčního v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 15$ s
(v % živých spermií)
- Graf 23.: Motilita spermií okouna říčního v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 30$ s
(v % živých spermií)
- Graf 24.: Motilita spermií okouna říčního v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 45$ s
(v % živých spermií)
- Graf 25.: Motilita spermií okouna říčního v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 60$ s
(v % živých spermií)
- Graf 26.: Rychlost spermií okouna říčního v testovacích médiích (m.s^{-1})
- Graf 27.: Rychlost spermií okouna říčního v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 15$ s (m.s^{-1})
- Graf 28.: Rychlost spermií okouna říčního v testovacích médiích s obsahem HgCl_2 v $t = 30$ s
(m.s^{-1})
- Graf 29.: Rychlost spermií okouna říčního v testovacích médiích s obsahem HgCl_2 v $t = 45$ s
(m.s^{-1})
- Graf 30.: Rychlost spermií okouna říčního v testovacích médiích s obsahem HgCl_2 v $t = 60$ s
(m.s^{-1})
- Graf 31.: Motilita spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích
(v % živých spermií)
- Graf 32.: Motilita spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 15$ s
(v % živých spermií)
- Graf 33.: Motilita spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 30$ s
(v % živých spermií)
- Graf 34.: Motilita spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 45$ s
(v % živých spermií)
- Graf 35.: Motilita spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl_2 v $t = 60$ s
(v % živých spermií)

Graf 36.: Rychlost spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s (m.s⁻¹)

Graf 37.: Rychlost spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 15 s
(m.s⁻¹)

Graf 38.: Rychlost spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 30 s
(m.s⁻¹)

Graf 39.: Rychlost spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 45 s
(m.s⁻¹)

Graf 40.: Rychlost spermií keříčkovce červenolemého v testovacích médiích s HgCl₂ v t = 60 s
(m.s⁻¹)

10. Abstrakt

Demembrance spermií ryb: návržení a ověření postupů u různých druhů sladkovodních ryb a demonstrace využití této techniky na příkladu studia vlivu těžkých kovů přímo na axonemu spermie

Cílem práce bylo navrhnout postup demembrance u čtyř druhů sladkovodních ryb a jeho následná aplikace studiem vlivu HgCl_2 na axonemu a pohybové parametry spermie.

Postupy demembrance byly navrženy a vyzkoušeny pro všechny zkoumané druhy a to kapra obecného (*Cyprinus carpio*), jesetera malého (*Acipenser ruthenus*), okouna říčního (*Perca fluviatilis*) a keříčkovce červenolemého (*Clarias gariepinus*).

Pro kapra obecného byly navrženy a vyzkoušeny jednostupňová a dvoustupňová metoda demembrance. Pro jesetera malého a okouna říčního byla navržena jednostupňová metoda. Pro keříčkovce červenolemého byl navržený dvoustupňový proces demembrance.

Možnost demembrance byla prokázána u všech zkoumaných druhů. U všech druhů došlo k prokazatelnému zvýšení doby pohyblivosti několikanásobně nad fyziologickou hodnotu. V případě ostatních pohybových parametrů (rychlost, procento pohyblivých spermií) došlo u demembranovaných spermií k mírnému poklesu.

Demembrance byla využita ke studiu vlivu HgCl_2 v koncentraci 0,01 mM do roztoku demembranačního média nemělo vliv na mikrotubulární aparát bičíku, a tedy ani na pohybové parametry demembranovaných spermií, s výjimkou spermií jesetera malého, kdy měl HgCl_2 inhibiční vliv ve všech použitých koncentracích. Koncentrace 0,1 mM působila inhibičně u kapra obecného a keříčkovce červenolemého. Koncentrace 1 mM HgCl_2 způsobila inhibičně na spermie všech zkoumaných druhů.

Klíčová slova: spermie ryb, demembrance spermií, motilita, chlorid rtuťnatý, kapr obecný, jeseter malý, okoun říční, keříčkovce červenolemý

11. Abstract

Demembration of fish sperm: Design and verification this procedure for the different species of freshwaterfish and demonstration usage of this technique by study the effect of heavy metals to sperm axoneme

The object of this study is to design demembration method on four freshwater species and its application on study of the influence of HgCl₂ on the axoneme and motity sperm motility parameters.

Demembration was designed and examined for all investigated species – common carp (*Cyprinus carpio*), sterlet (*Acipenser ruthenus*), perch (*Perca fluviatilis*) and african catfish (*Clarias gariepinus*).

One-step and two-step method was designed and tested for common carp. One-step method was designed for sterlet and perch. Two-step method of demembration was designed for african catfish.

Demembration was designed and examined for all species under examination. Sperm motility was evidently increased above normal physiological value. Other sperm motility parameters (velocity, percent of motile cells) slightly decreased.

HgCl₂ in concentration 0,01 mM to the demembration medium didn't show effect on flagellar microtubule aparat and then to the motility parameters, except sterlet; demembrated sterlet sperm was inhibited at all used concentration of HgCl₂. Concentration 0,1 mM had inhibition effect on carp and africant catfish spermatozoa. Concentration 1 mM HgCl₂ inhibited sperm of all tested species.

Key words: fish sperm, sperm demembration, motility, mercury chloride, common carp, sterlet, perch, african catfish