

Metody stanovení kvality a kvantity spermatu ryb



Otázky ke zkoušce

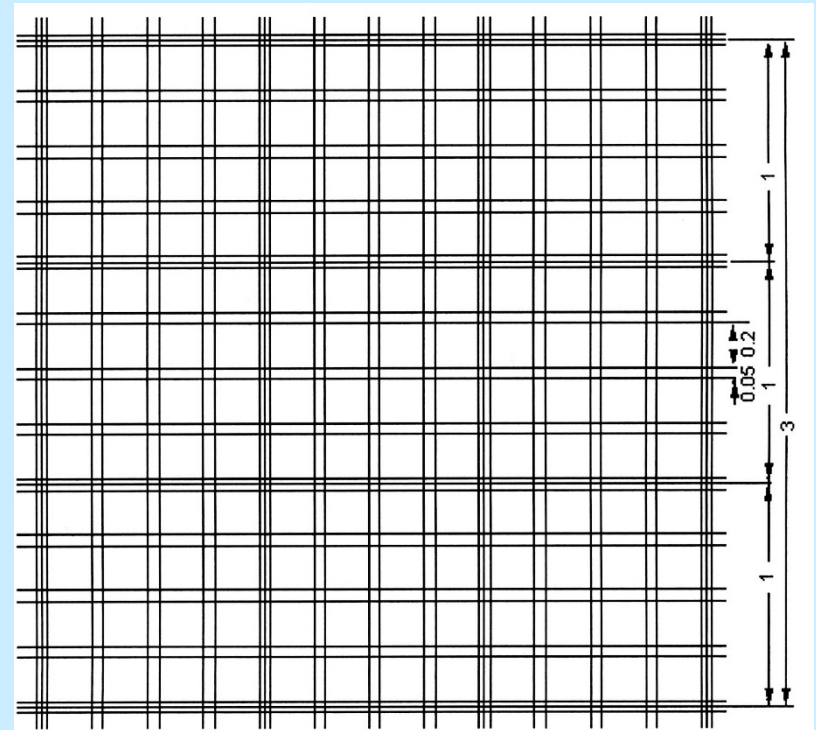
- Příklad stanovení kvantity spermatu u kapra o hmotnosti 10 kg s 10 spermiemi v jednom čtverci $1/16 \text{ mm}^2$
- Mikroskopické hodnocení kvality spermatu ryb
- Hodnocení osmotické úrovně a ATP spermatu a testy fertility

Odlišnosti spermatu u ryb

- **aktivace pohybu až po styku s vodou (aktivačním médiem)**
 - **velmi krátká doba pohyblivosti (20s - několik minut)**
 - **relativně vysoká rychlost pohybu (100-300 $\mu\text{m.s}^{-1}$)**
 - **značné mezidruhové rozdíly**

Stanovení kvantity spermií výpočtem v počítací komůrce

- Příklad použití
Burkerovy
komůrky Velikost 3
mm x 3 mm x 0,1 mm
- Pro vlastní počítání
počítáme spermie v 16
velkých čtvercích každý
o velikosti $1/16 \text{ mm}^2$
výsledkem pro výpočet
je plocha 1 mm^2



Propočet kvantity spermií

- Ve čtverci počítáme všechny buňky uvnitř čtverce a buňky na dvou okrajích
- Sumu 16 čtverců vynásobíme 10 čímž dostaneme počet spermií v 1 mm³
- Dále vynásobíme 1000 čímž máme hodnotu počtu spermií v 1 ml (1 cm³)
- Protože jsme sperma předem naředili např. u kapra 1:10000 ve fyziologickém roztoku musíme celé množství vynásobit 10000, výsledkem je koncentrace spermií v 1 ml
- Rekapitulace výpočtu
- Suma 16 čtverců x 10 x 1000 x úroveň ředění (kapr např. 10000 = např. u kapra $17 \times 10^9 \text{xml}^{-1}$)
- Sperma u kterého byla zjištěna koncentrace bylo získáno v celkovém objemu 20 ml spermatu a mlíčák měl hmotnost 6 kg
- Potom úroveň spermiace představovala u mlíčáka hodnotu $17 \times 20 = 340 \times 10^9 \text{xml}^{-1}$, při relativním vyjádření na kg hmotnosti mlíčáka bylo získáno $340:6 = 56,67 \times 10^9 \text{xml}^{-1}$ spermií
- V případě nutnosti fixace spermatu se provede předředění fyziologickým roztokem v poměru od 1:10 do 1:100 podle druhů ryb s následnou fixací 4 % formaldehydem s finalní úrovní formaldehydu na úrovni 1-2 %.

Technické rozdělení metod pro hodnocení kvality spermatu

makroskopické

barva spermatu
konzistence spermatu
přimíseniny ve spermatu

mikroskopické

koncentrace spermií (10^9 spermií v ml)
podíl pohyblivých spermií (motilita) (%)
rychlost pohybu spermií ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)
frekvence pohybu bičíku (Hz)
zakřivení dráhy pohybu spermie (μm)
parametry zakřivení bičíku (počet ohybů, amplituda výkyvu) (μm)
podíl živých a mrtvých buněk (%)

chemické a fyzikální

osmotická úroveň ($\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$)
obsah ATP ($\text{nmol} \cdot 10^{-8}$ spermií)

biologické

(testy fertility)

oplozenost (%)
líhnivost (%)
výskyt deformací plůdku (%)

Makroskopické metody:

Předpoklady: znalost druhových specifík

Výhody: levné, nenáročné na vybavení a znalosti

Nevýhody: nepřesné, subjektivní hodnocení s pouze orientačním významem

Např. : tzv „kapková metoda“

do Petriho misky s vodou (aktivačním médiem) se kápne kapka spermatu. Podle rozptýlení spermatu a rozptylování spermií je možno usuzovat na kvalitu - motilitu spermií

Mikroskopické metody:

Předpoklady: mikroskopické vybavení

Výhody: přesnější, objektivnější hodnocení

Nevýhody: náročnější na vybavení a čas

2 kroky

vizualizace

osvětlení

zvětšení

hodnocení

v reálném čase

ze záznamu

vizualizace

osvětlení

procházející světlo

fázový kontrast

tmavé pole

tmavé pole + stroboskopické světlo

UV(fluorescence)

zvětšení

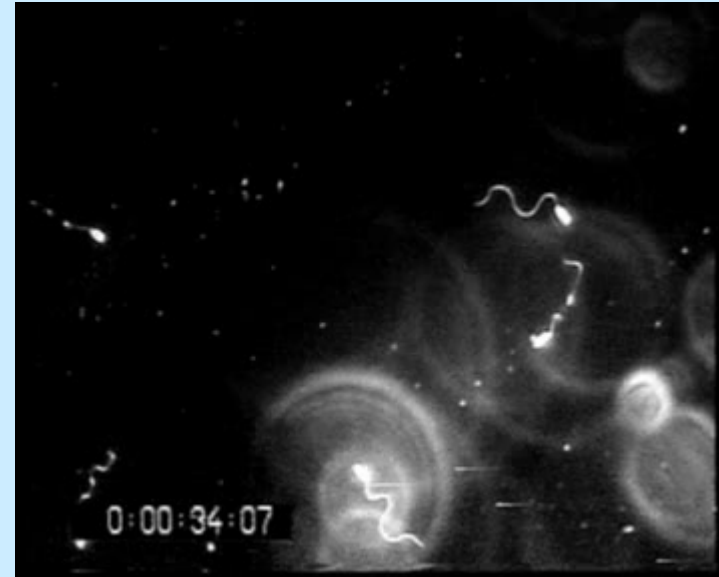
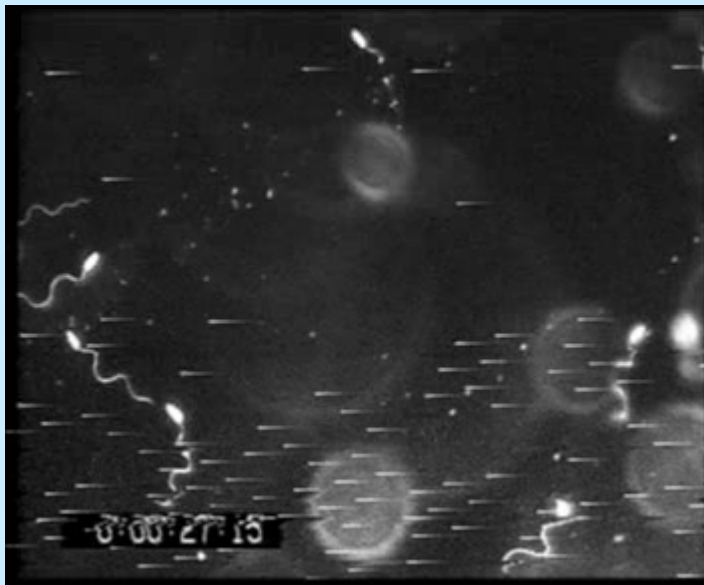
objektiv 10x - 20x - 40x

hodnocení

v reálném čase

odhad motility

měření frekvence pohybu bičíku



Zjišťování podílu živých a mrtvých buněk s použitím fluorescenční mikroskopie

M.Rodina, O.Linhart, Učební text
Reprodukce ryb, 2018

Hodnocení se obvykle provádí ze záznamu (videozáznamu)

- videozáznam (digitální systémy DV, MiniDV, Digital8)
- digitalizace videosnímků nebo sekvencí (digitalizační karty PC, digitální kamery)
- zpracování digitalizovaných dat

„manuálně“ - programy na 2D analýzu obrazu

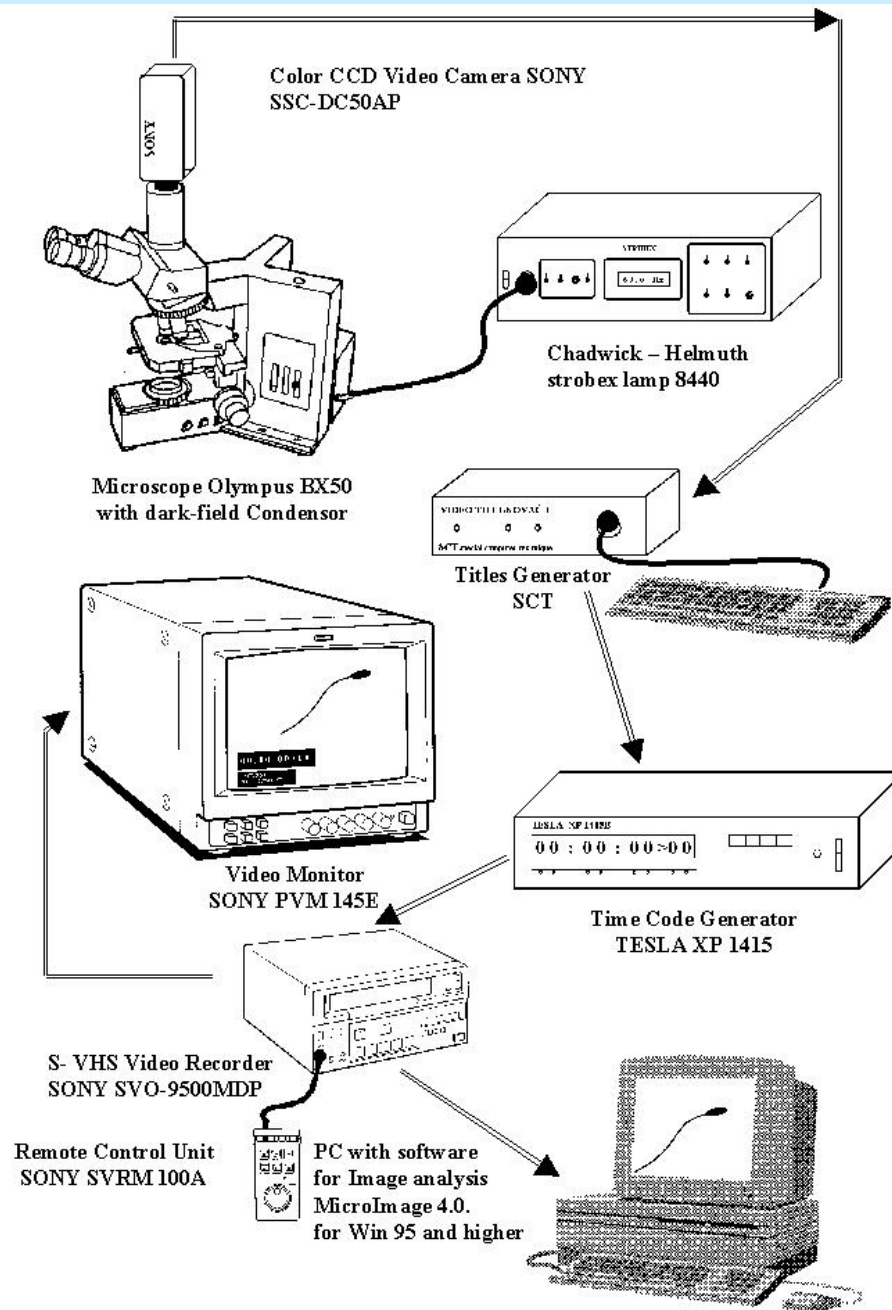
podíl pohyblivých spermií (motilita) (%)

rychlost pohybu spermií ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)

zakřivení dráhy pohybu spermie (μm)

parametry zakřivení bičíku (počet ohybů,
amplituda výkyvu)(μm)

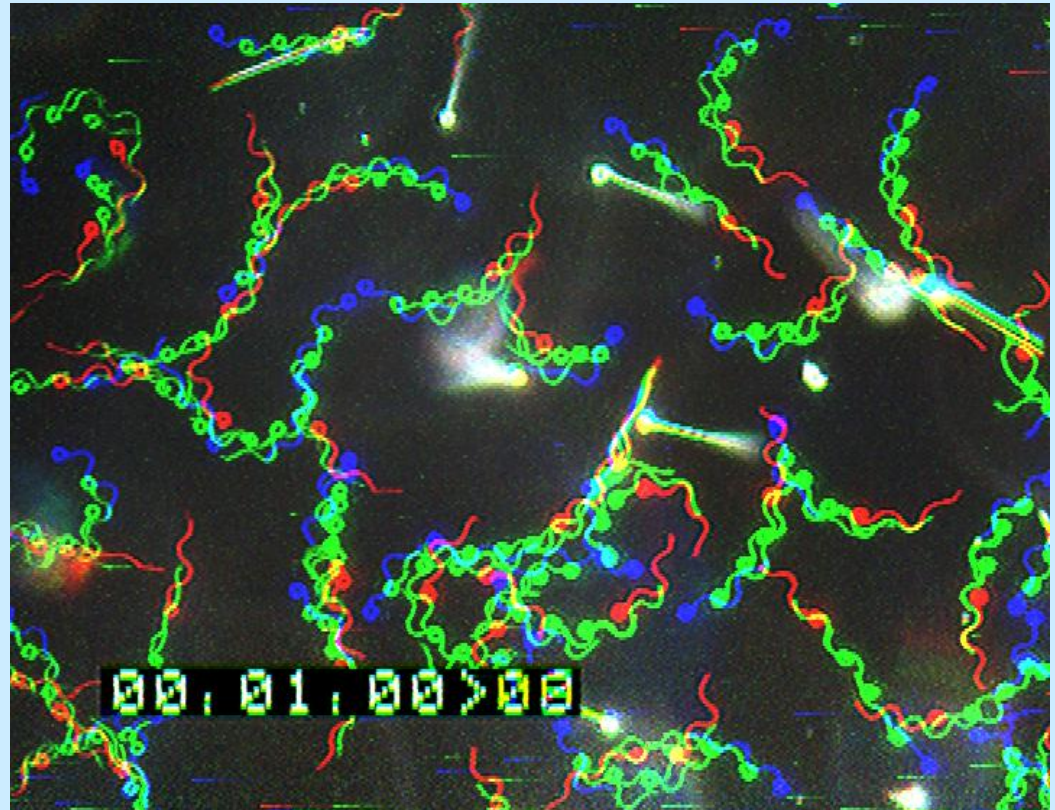
automaticky - analyzátory pohybu spermií, „sperm trackery“
označované jako CASA systémy.



Rychlost pohybu spermií a motilita

2. složení obrázků:

- pomocí funkce *Image Overlay (nastavení On darker only)* jsou složeny všechny snímky (mimo první a poslední) v nový
- pomocí funkce *Color chanel* jsou složeny první, nový a poslední snímek jako jednotlivé složky systému RGB
- výsledkem je barevná stopa pohybujících se spermií a bílý obraz nepohyblivých spermií

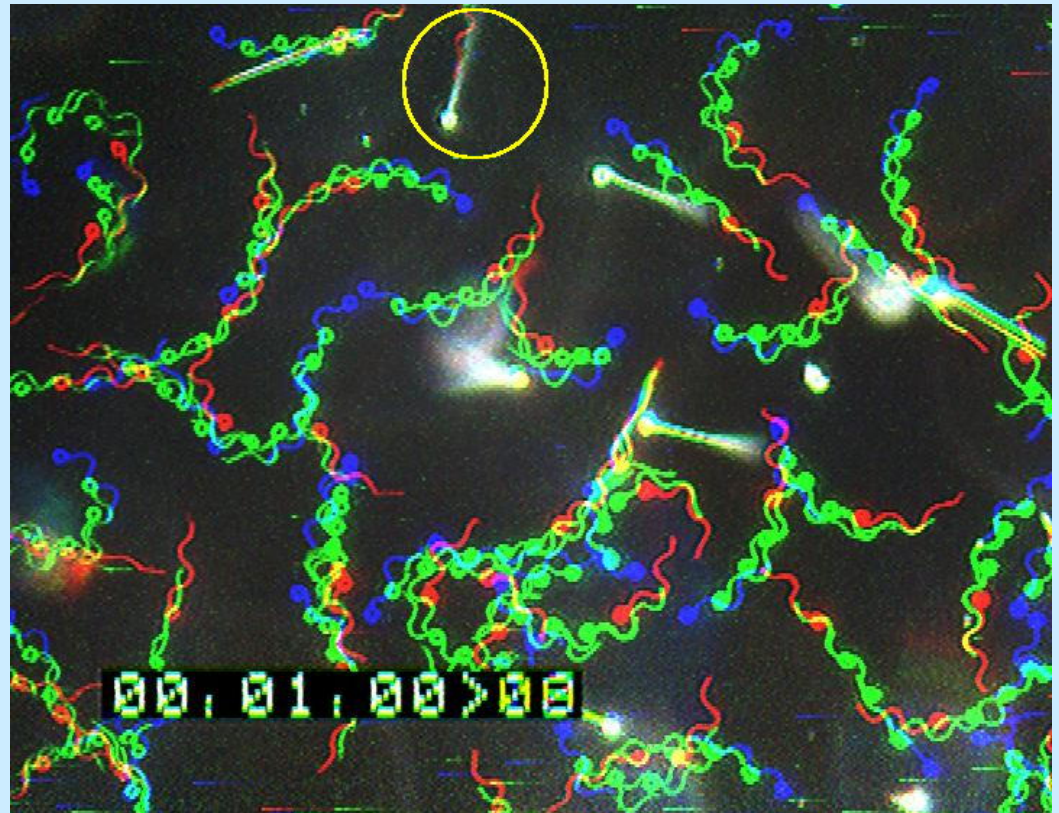


Spermie lína obecného (*Tinca tinca*), testikulární sperma, aktivace 40 mM NaCl, 60 s po aktivaci

Rychlost pohybu spermií a motilita

3. měření:

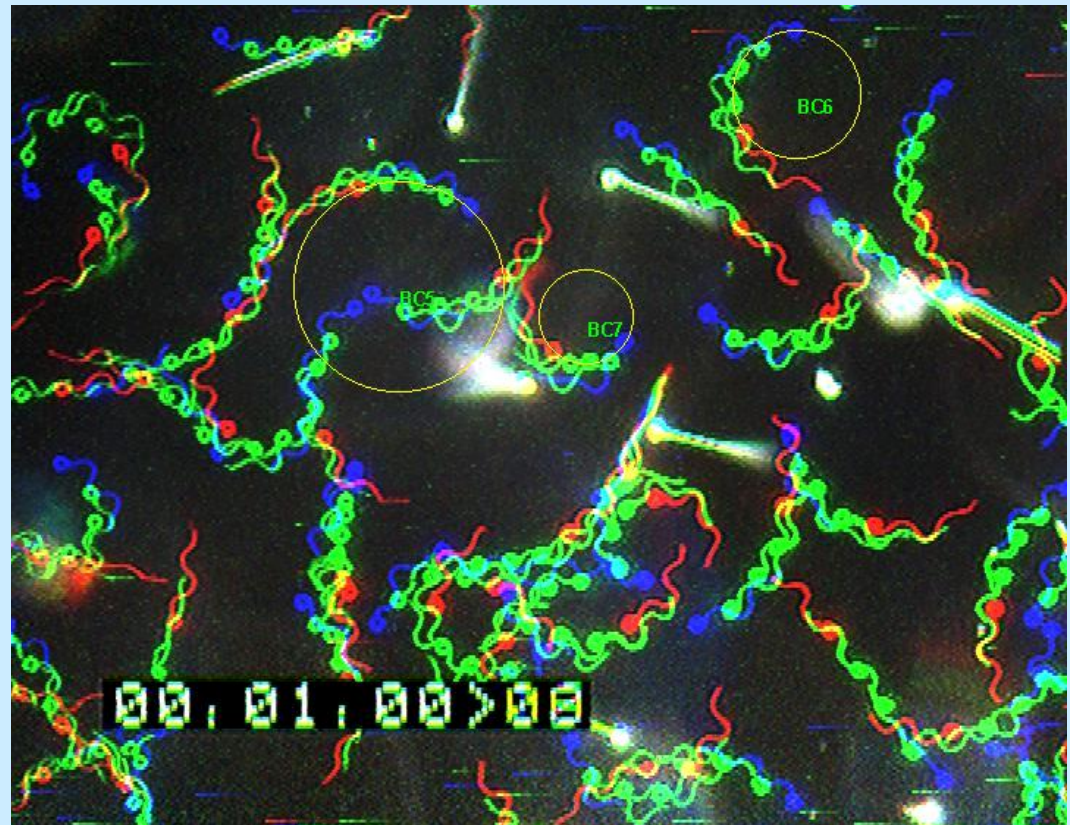
- rychlost pohybu se počítá z délky dráhy pohybu (měřené nástrojem *Manual measurements*) a z času (určeného podle počtu a odstupu videosnímků - snímková frekvence systému PAL 25 snímků za 1s)
- motilita se počítá jako procentický podíl barevně zobrazených spermií na snímku



Spermie lína obecného (*Tinca tinca*), testikulární sperma, aktivace 40 mM NaCl, 60 s po aktivaci

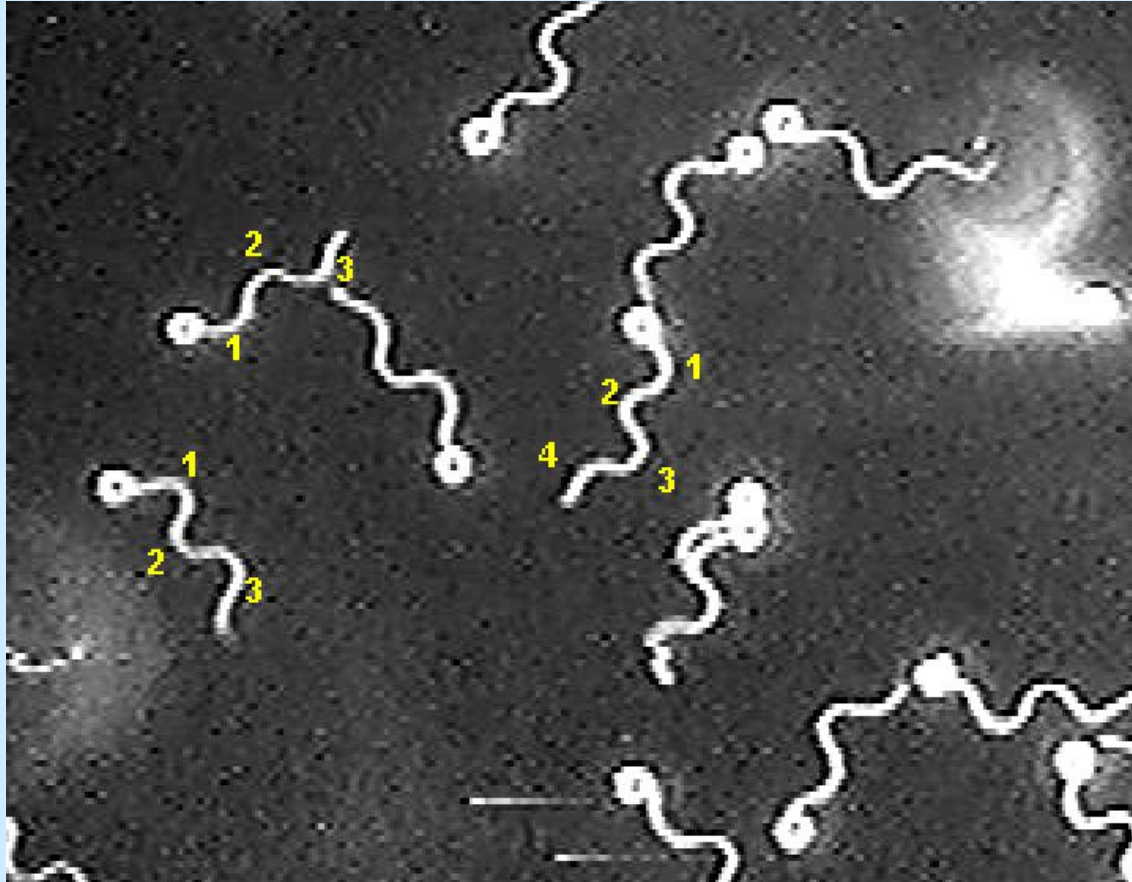
Zakřivení dráhy pohybu spermie

Zakřivení dráhy pohybu spermie se měří nástrojem *Manual measurements* (žlutý kruh)



Spermie lína obecného (*Tinca tinca*), testikulární sperma, aktivace 40 mM NaCl, 60 s po aktivaci

Parametry zakřivení bičíku spermie, počet amplitud bičíku atd.



Spermie lína obecného (Tinca tinca), testikulární sperma,
aktivace 40 mM NaCl, 60 s po aktivaci

Hodnocení z videozáznamu automaticky - analyzátory pohybu spermií, „trackery“

Předpoklady: kvalita záznamu (zvětšení, kontrast, počet objektů v zorném poli, zaostření, rozlišení, artefakty, rušení)

Výhody: rychlost zpracování záznamů, velké množství parametrů, opakovatelnost

Nevýhody: citlivost na kvalitu záznamu, možnost logických chyb, nemožnost korekce artefaktů

Kroky:

- kalibrace a nastavení (měřítko, videosystém, požadovaný počet měření)
- naprahování měřených objektů
- nahrání videosekvence, její zpracování a uložení výsledků

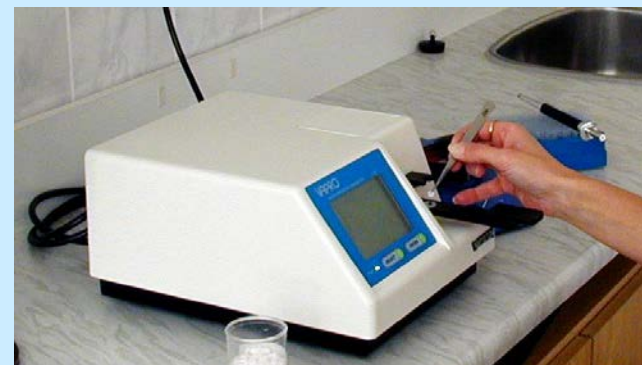
Chemické a fyzikální metody

Měření osmotické úrovně spermatu

Princip: měření celkového množství osmoticky aktivních látek (snížená osmotická úroveň může být signálem aktivace spermatu močí, a tím i vyčerpání energie spermie a snížení schopnosti pohybu spermií) na osmometru.

Osmometry- 2 principy: odpařovací a vymražovací

Výhody: jednoduchá obsluha, rychlost



Nevýhody: drahý jednoúčelový přístroj, výsledek nemusí odrážet kvalitu spermatu, ale je pouze doplňkovým ukazatelem.

Chemické a fyzikální metody

Měření obsahu ATP ve spermiích

Princip: měření obsahu ATP ve spermiích (jako základní energetické látky potřebné pro buňku) bioluminometrem z extraktu lýzovaných spermií

Postup:

- stanovení koncentrace spermií (počítáním v Burkerově komůrce)
- lýzování spermií a extrakce ATP v horkém HEPES pufru (95°C)
- odstředění buněčné drtě
- přidání luciferin luciferázy ke vzorku a měření na bioluminometru
- výpočet koncentrace ATP (nM na 10^8 spermií)

Výhody: přímé zjištění obsahu ATP

Nevýhody: nákladná technika i provoz (chemikálie),



Biologické metody - testy fertility

Přímé otestování spermatu na jikrách - miskové pokusy

Předpoklady:

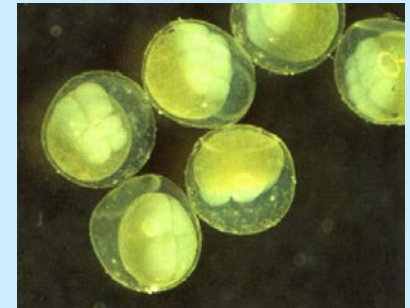
- kalkulace počtu spermií na 1 jikru (nejlépe motilních spermií)
- kalkulace objemu aktivčního média

Vyhodnocování:

- oplozenost ve stádiu 8-32 blastomer (výsledek ovlivní výskyt partenogeneze a polyspermie)
- oplozenost po 24 hodinách (makroskopicky) z počtu nasazovaných jiker v %
- celková líhnivost plůdku z počtu nasazovaných jiker v %
- % výskytu deformací plůdku z množství vylíhlého plůdku

Výhody: hodnotíme přímo oplozovací schopnost spermií, nikoliv pouze nepřímé parametry; levné a nenáročná metoda.

Nevýhody: výsledek ovlivněn dalšími proměnnými - kvalitou jiker, podmínkami inkubace; výsledek je znám s časovým odstupem.



Závěr:

**Při volbě vhodné metody hodnocení kvality spermatu u ryb je třeba
zohlednit:**

- **účel**
- **technické možnosti a zkušenosti**
- **časovou náročnost**