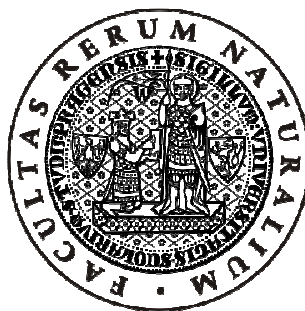


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie

Studijní obor: zoologie



Mgr. Martin Šandera

Strategie spermií hlodavců v procesu oplození

Sperm strategies in rodents

Disertační práce

Vedoucí práce: Doc. Mgr. Pavel Stopka, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Kateřina Hortová, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30. 6. 2011

Podpis:

Poděkování

Děkuji Pavlu Stopkovi za vedení práce. Kateřině Hortové děkuji za konzultace. Petře Andrlíkové, Michaelae Frolíkové a Tomáši Albrechtovi děkuji za pomoc, cenné rady a připomínky.

Děkuji současným kolegům na poli výzkumném za rozmanitou pomoc (v abecedním pořadí příjmení): Martina Černá, Kristina Daniszová, Denisa Hladovcová, Kateřina Janotová, Štěpán Ryba, Romana Stopková, Nataša Šebková a Jan Suchan; i na poli laboratorním za pomoc a rady: Lenka Bulvová, Marie Nohýnková, Ludmila Pospíšilová, Ivana Rašplíčková a Helena Uhlířová.

Děkuji dřívějším bývalým kolegům: Adam Dušek, Petr Jedelský a Marcela Lucová; a laboratorním pracovnícím: Petra Čajová, Jarmila Juklová, Zuzana Merková a Mariana Sitárová.

Pavlovi Němcovi děkuji za zapůjčení programu analySIS.

Děkuji těm, kteří poskytli hlodavce nebo mi poradili či různorodě umožnili chytání hlodavců: Sabine Begall, Josef Bryja, Petra Hagemeyer, Milan Kaftan, Pavel Munclinger, Jaroslav Piálek, Marcus Schmitt, Michal Stanko, Vladimír Vohralík, Christiane Vole a Jan Zima.

Děkuji těm, kteří mi pomohli při chytání hlodavců: Jindřich Brejcha, Barbora Dudková, Markéta Havlová, Vojtěch Miller a Radek Sečka.

Děkuji v neposlední řadě recenzentům a oponentům za bedlivé pročtení textů, za posudky a za podnětné připomínky.

Rodině, příbuzenstvu a přátelům děkuji za veškerou podporu a fandění. Speciálně manželce Haně a synovi Janovi, který mj. pomáhal i při chytání hlodavců (viz obr. níže).

Práce byla finančně podpořena granty:

GA AV IAA601110908, GA AV KJB601110923, GA ČR 206/07/077, MŠMT VC 1M06011, MŠMT VZ 0021620828.

Se zvířaty bylo zacházeno v souladu s platnými zákony a předpisy.



Jan Šandera při chytání hlodavců, lokalita: Praha – Lysolaje, 15. 6. 2010,
foto: Martin Šandera.

Obsah

Souhrn	2
1. Úvod.....	6
1.1. Spermie.....	7
1.2. Membránové proteiny spermií.....	9
1.3. Kompetice spermií.....	9
1.4. Environmentální vlivy na spermie.....	11
2. Cíle	13
3. Výsledky a diskuse	14
4. Seznam publikací	23
5. Závěry.....	24
6. Literatura.....	26
7. Publikace.....	32
8. Přílohy	35

Souhrn

Různé druhy hlodavců se liší způsobem života, párovacími systémy a liší se i v morfologii spermií. U hlodavců se vyskytují různé úrovně kompetice spermií. Obecně u živočichů se má za to, že díky kompetici spermií dochází k prodlužování bičků spermií. Jak přesně působí kompetice spermií u hlodavců? Druhově specifický sexuální výběr může optimalizovat morfologii spermií. Fyziologii, morfologii a kompetici spermií můžou ovlivňovat i environmentální faktory.

Disertační práce byla zaměřena na reprodukční strategie hlodavců na úrovni spermií a to na základě morfologických a behaviorálních vlastností spermií. Práce obsahuje tři publikace (včetně jednoho odeslaného rukopisu) a v příloze jeden článek, který okrajově souvisí s tématem práce.

Morfologie spermií u hlodavců hraje důležitou roli v kompetici spermií. Delší bičky a apikální háčky jsou u druhů s relativně většími varlaty a vyšším procentem násobného otcovství (multiple paternity), tedy u druhů s vyšší mírou promiskuity a vyšší mírou kompetice spermií. Jedním z cílů bylo zjistit vztahy délky apikálních háčků a bičků spermií a variability v těchto znacích s relativní hmotností varlat. Výsledky této práce ukázaly, že průkazně delší apikální háčky byly u druhů s vyšší relativní hmotností varlat (tzn. vyšší mírou kompetice spermií), což poukázalo na usměrňující výběr na fenotyp spermií. Zvýšená míra kompetice spermií vedla ke snížení variability v délce apikálních háčků, což nasvědčuje na stabilizující výběr.

Další studie byla zaměřena na změny úhlů zahnutí apikálních háčků spermií v závěrečné fázi spermiogeneze a ve fázi před oplodněním. Průběh změn zahnutí byl opačný u myšic (*Apodemus sylvaticus* a *A. agrarius*) v porovnání s myší (*Mus musculus*). U myšic se značně lišily úhly u dormantních a aktivních spermií. U všech druhů, ve všech stádiích byl zjištěn velký rozsah hodnot úhlů zahnutí, z tohoto pohledu se jeví měření úhlů pro hodnocení míry kompetice spermií méně vhodné než měření délky apikálních háčků. Rozsah hodnot úhlů ukázal na míru flexibility apikálních háčků.

Cílem další studie bylo zjistit vliv účinku fluoridových iontů a fluorohlinitanových komplexů u myší na spermatogenezi *in vivo* a na kapacitaci spermií *in vitro*. Zjistili jsme, že

zvýšená koncentrace iontů vedla ke snížení úrovně spermatogeneze, kvalitativnímu ovlivnění morfologické struktury tkáně varlat a ovlivnění schopnosti spermií úspěšně podstoupit kapacitaci.

Téma článku v příloze bylo zaměřeno na proteiny, které se podílejí na pachové (chemické) komunikaci u hlodavců a můžou ovlivňovat různé biologické procesy, včetně kompetice spermií.

Summary

Rodents exhibit diverse biology, mating systems and diverse sperm morphology. Different levels of sperm competition have therefore been found in this group. Generally, it is accepted that sperm competition in animals causes the prolongation of sperm tails. However, what other sperm morphological adaptations in rodents are affected by sperm competition? Species-specific sexual selection likely optimizes sperm morphology. Sperm physiology, morphology and competition may be influenced, ultimately, by environmental factors.

This Ph.D. thesis focuses on sperm competition in murine rodents. The thesis contains three research articles (including one as a submitted manuscript). In addition, another published article, partially related to the topic of this thesis, is represented in the Appendix.

The sperm morphology in rodents plays an important role in sperm competition. Longer tails and apical hooks are usually found in the species with relatively larger testes and with higher percentage of multiple paternity (i.e. rate of promiscuity), that is in species with the higher risk of sperm competition. The goal of the first study was to investigate the relationships between relative testis weight and sperm traits (apical hook and tail lengths and variance in this traits). The apical hook length was positively associated with relative testis mass thus indicating directional post-copulatory selection on sperm phenotypes. Moreover, our study shows that increased levels of sperm competition lead to the reduction of variance in the hook length, indicating stabilizing selection.

The second study focused on the changes in the curvature of sperm apical hooks during the final stages of spermiogenesis and stages before fertilization. Apical hook curvatures of field mice (*Apodemus agrarius* and *A. sylvaticus*) varied significantly between dormant and active sperm. In contrast, there was no significant difference among the stages in the eastern house mouse (*Mus musculus*). Since there are high ranges of angle values in all stages, the mean angles of apical hook curvature are not appropriate for evaluating the risk of sperm competition, though the ranges of angle values point to the level of flexibility of the apical hooks.

The objective of third study was to investigate the *in vivo* effect of fluoride and aluminium ions in mice on spermatogenesis and on capacitation *in vitro*. We found that the exposure of mice to an increased concentration of ions resulted in a decreased level of spermatogenesis, qualitatively affected the morphological structure of the testicular tissue and modified the ability of mouse sperm to successfully undergo capacitation.

The paper in the Appendix is related to proteins that are involved in chemical communication in rodents and may have some impact on biological processes, including sperm competition.

1. Úvod

Reprodukční úspěch samce záleží na počtu jím oplodněných samic, respektive vajíček, zejména u druhů, u kterých samec neinvestuje do potomstva (Gomendio et al. 1998). Většina druhů savců je polygamiálních a samci mezi sebou různě soupeří o samice, kompetice se však odehrává i na úrovni spermií (Gomendio et al. 1998).

Výzkumy u savců ukázaly, že samci polygamiálních (promiskuitních) druhů mají relativně větší varlata a produkují více spermií než druhy monogamní (Harcourt et al. 1981, Kenagy et Trombulak 1986, Roldan et al. 1992). Produkce většího množství spermií může být efektivní strategií (Roldan et al. 1992, Breed et Taylor 2000). Samci mohou operativně zvyšovat množství spermií v ejakulátu v případě, že páří samici odpářenou před tím jiným samcem (delBarco-Trillo et Ferkin 2004). Nebo naopak mohou případně množství spermií v ejakulátu snižovat (Ramm et Stockley 2007).

Pouhá inseminace samice a snaha ji hlídat však nemusí zaručovat reprodukční úspěch pro samce (Roldan et al. 1992). U savců a zejména u hlodavců došlo k prodloužení bičíků spermií, což je vysvětlováno jako adaptace na viskóznější prostředí v pohlavním traktu samice a na zvýšenou míru kompetice spermií (Roldan et al. 1992). Spermie s delším bičíkem by se měla v samičím pohlavním traktu pohybovat rychleji a dříve dosáhnout vajíčka (Roldan et al. 1992).

Předpokládalo se, že rozdíly ve velikosti varlat a délce bičíků spermií budou mezi jednotlivými vývojovými liniemi (Roldan et al. 1992), avšak u některých rodů byly zjištěny mezidruhové rozdíly u fylogeneticky blízkých druhů (Breed et Taylor 2000). Vzhledem k rozdílností v sociálním chování a párovacích systémech se dalo očekávat, že se u příbuzných druhů budou vyskytovat rozdílné strategie spermií v procesu oplození (Stopka et Macdonald 1998, Stopka et Graciasová 2001).

Významný objev byl učiněn u promiskuitního druhu, myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*). Bylo zjištěno, že spermie spolu kooperují, vzájemně se shlukují a vytvářejí protáhlé agregace, tzv. vláčky (Moore et al. 2002). Spermie se zapojují pomocí apikálních háčků za bičík nebo hlavičku, shluky spermií se pohybují rychleji než samotná spermie a tím pádem vláček doputuje k vajíčku dříve (Moore et al. 2002). Ukázal se význam apikálního

háčku na hlavičce spermií hlodavců a význam vláček jako možné výhodné strategie v kompetici spermií (Moore et al. 2002, Immler et al. 2007).

Svoji úlohu v kompetici spermií mají nejspíš i membránové proteiny spermií, zejména ty, které jsou spojené s akrozomální reakcí a ochranou spermií před komplementem (Johnson et al. 2007, Clift et al. 2009 a, Clift et al. 2009 b).

Environmentální ovlivnění kompetice spermií může být významné zejména při negativním působení některých látek. Ovlivněna může být kvalita a fyziologie spermií a tím schopnost fertilizace. Takovými látkami mohou být i fluoridy a fluorohlinitanové komplexy (Ghosh et al. 2002, Ortiz-Pérez et al. 2003, Pushpalatha et al. 2005).

Kompetice spermií může být ovlivňována i pachovou signalizací (delBarco-Trillo et Ferkin 2004). Lipokaliny jsou transportní proteiny pro feromony, které řídí či ovlivňují chování živočichů, včetně epigamních projevů. Některé lipokaliny tak pomáhají např. při stimulaci páření (Stopková et al. 2010).

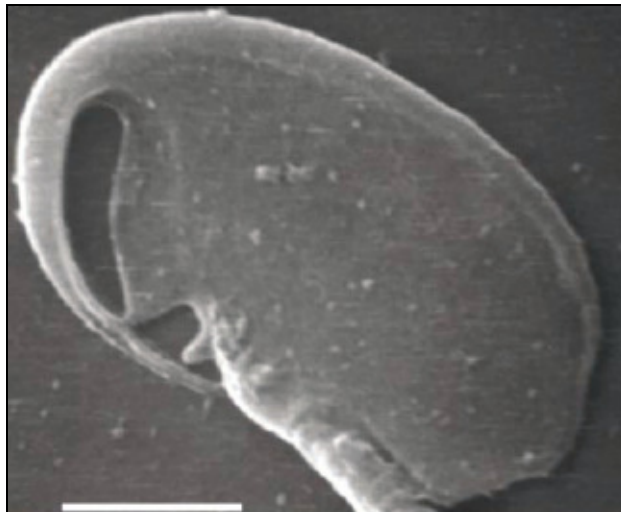
1.1. Spermie

Spermie vznikají v průběhu spermatogeneze (přes proliferační a meiotickou fázi) a následné spermiogeneze (diferenciační fáze – tvorba bičíku, redukce cytoplazmy, vytvoření akrozómu atd.) v semenotvorných kanálcích varlat (Bustos-Obregon et al. 1975). K maturaci (získání funkční zralosti) dochází při průchodu nadvarletem (*epididymis*) a zralé spermie se uchovávají v koncové části nadvarlate (*cauda epididymidis*) (Bustos-Obregon et al. 1975). Spermie savců musí po ejakulaci projít biochemickými změnami zvanými kapacitace, aby byly schopny oplození vajíčka, jemuž předchází akrozomální reakce indukovaná glykoproteinovým obalem vajíčka (*zona pellucida*) a následná fúze membrán obou germinálních buněk (Austin 1951, Chang 1951). Sertoliho buňky v semenotvorných kanálcích varlat jsou somatické podpůrné buňky zajišťující spermatogenezi. Počet spermatických buněk, které je Sertoliho buňka schopna podporovat, je druhově specifický, v dospělosti je počet Sertoliho buněk definitivní a tak je limitujícím faktorem pro počet vznikajících spermií (Russel et Peterson 1984, Berndtson et al. 1987).

Savčí spermie je tvořena dvěma zřetelně odlišnými částmi, hlavičkou (obsahuje především jádro a akrozóm) a bičíkem (obsahuje struktury zodpovědné za pohyb spermie) (Bedford et Hoskins 1990).

Na bičíku je možné běžně odlišit tři části. Střední část (mid piece) je nápadně širší než zbývající části a je vymezena annulem na pomezí s hlavní částí bičíku (Fawcett 1975, Bedford et Hoskins 1990). Střední část bičíku je „motorem“ (hlavním energetickým centrem) spermie, obsahuje desítky mitochondrií v podobě helikální pochvy ovinuté okolo axonemy (mikrotubulární struktury) (Fawcett 1975, Bedford et Hoskins 1990). Hlavní část (principal piece) je nejdelší částí bičíku s probíhající axonemou krytou fibrózním pouzdrem (Fawcett 1975, Bedford et Hoskins 1990). Koncová část (end piece) je nejkratší a nejtenčí část a obsahuje axonemu krytou pouze plazmatickou membránou (Fawcett 1975, Bedford et Hoskins 1990).

Spermie hlodavců vykazují značnou rozmanitost zejména v morfologii hlavičky. Řada druhů má apikální háčky (Obr. 1) nebo prodloužené útvary u báze hlavičky (Šebek 1962, Roldan et al. 1992, Breed 2004, Breed 2005). Ukázalo se, že apikální háčky se vyskytovaly u většiny zkoumaných druhů a že nepřítomnost či ztráta apikálního háčku je nejspíš odvozený stav (Breed 2004, Breed 2005).



Obr. 1. Detail hlavičky spermie myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*) s nápadným apikálním háčkem. Převzato z Moor et al. (2002), snímek pořízen pomocí skenovacího elektronového mikroskopu, měřítko 2,5 μm .

1.2. Membránové proteiny spermií

Mezi řadou membránových proteinů spermií jsou v souvislosti s kompeticí spermií důležité především proteiny spojené s akrozomální reakcí. Glykoprotein CD46 (membrane cofactor protein) zřejmě stabilizuje akrozomální membránu, aby nedocházelo k předčasné spontánní akrozomální reakci (Inoue et al. 2003). CD46 chrání somatické buňky savců před vlastním imunitním systémem (působením komplementu), spermie chrání před působením komplementu v samičím reprodukčním traktu (Liszewski et al. 2005).

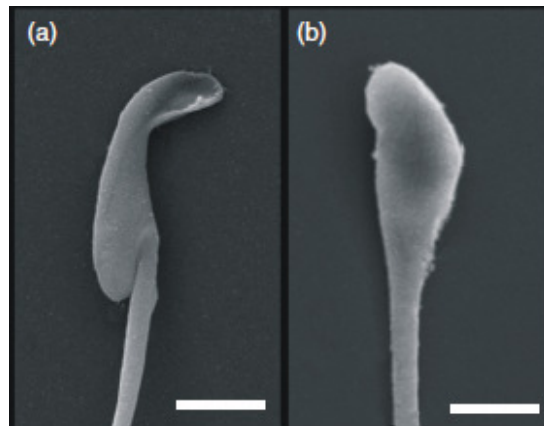
Spermie myši s neaktivním genem pro CD46 vykazovaly zvýšenou spontánní akrozomální reakci a překvapivě zvýšenou produkci potomků (Inoue et al. 2003). Myšice jsou „přirozenými knockouty“ pro CD46, mají specifickou variantu genu CD46 (chybí exony 5-7), což má za následek absenci tohoto proteinu na spermiích (Johnson et al. 2007, Clift et al. 2009 a, Clift et al. 2009 b). Myšice mají oproti myším výrazně zvýšenou expresi proteinů CD55 a CD59 (Clift et al. 2009b). Tyto proteiny nejspíš přebírají funkci proteinu CD46 v ochraně spermií před zničením komplementem v samičím reprodukčním traktu (Clift et al. 2009 b).

1.3. Kompetice spermií

Kompetice spermií je považována za evoluční selekční sílu (Gage et Freckleton 2003, Fisher et Hoekstra 2010, Montoto et al. 2011). Kompetice spermií odráží epigamní chování a morfologii živočichů (Roldan et al. 1992, Breed et Taylor 2000, delBarco-Trillo et Ferkin 2004) a chování a morfologii vlastních spermií (Moor et al. 2002; Immler et al. 2007, Fisher et Hoekstra 2010). Některé morfologické znaky spermií ukazují na míru kompetice spermií (Immler et al. 2007) a mohou být ovlivněny usměrňujícím výběrem (Calhim et al. 2007, Immler et Birkhead 2007) a nebo stabilizujícím výběrem (Calhim et al. 2007, Lifjeld et al. 2010).

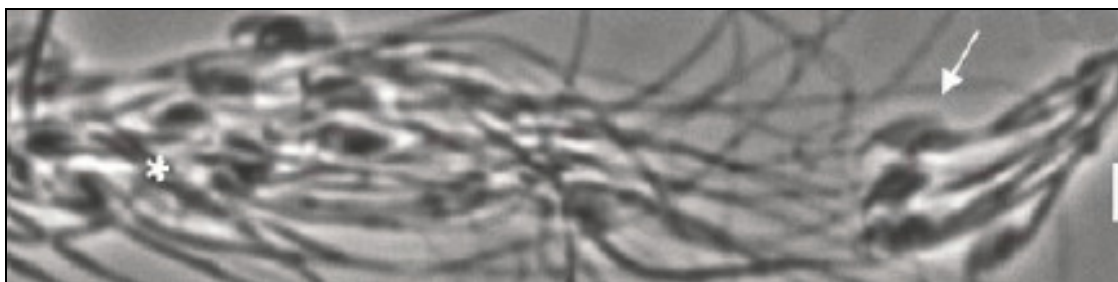
Druhy s vyšší mírou kompetice spermií mají delší spermie (Roldan et al. 1992, Breed et Taylor 2000). Avšak srovnávací studie různých skupin savců nepotvrdila vztah mezi délkou spermií a mírou kompetice spermií (Gage et Freckleton 2003). Variabilita v délce spermií se u pěvců ukázala jako dobrý ukazatel míry kompetice spermií (Lifjeld et al. 2010). U pěvců kompetice spermií působí na snížení variability v délce spermií (Immler et al. 2008, Kleven et al. 2008, Lifjeld et al. 2010).

Důležitou strukturou na hlavičce spermií řady druhů hlodavců je apikální háček (Obr. 1, Obr. 2 a). Díky apikálním háčkům se spermie mohou vzájemně zapojovat a vytvářet agregace, tzv. vláčky (Moor et al. 2002, Immler et al 2007). U myšovitých hlodavců je apikální háček ancestrální znak, jeho ztráta (Obr. 2 b) je odvozená (Breed 2004, Breed 2005). Delší a více zahnuté apikální háčky jsou u druhů s relativně většími varlaty, tedy u druhů s vyšší mírou kompetice spermií (Immler et al. 2007).



Obr. 2. Detail hlavičky spermie bandikoty menší (*Bandicota bengalensis*) s apikálním háčkem (a) a spermie bandikoty indické (*Bandicota indica*) bez apikálního háčku (b). Převzato z Breed et al. (2007), snímek pořízen pomocí skenovacího elektronového mikroskopu, měřítko 2,5 μm (a), 4 μm (b).

Zapojování spermií myšic do vláčků (Obr. 3) bylo klasifikováno jako kooperativní chování (Moor et al. 2002). Protažené shluky čítají stovky, někdy až tisíce spermií (Moor et al. 2002). Vláčky se pohybují rychleji než samotná spermie, takže se jeví jako výhodná strategie v kompetici spermií (Moor et al 2002). Výhodná strategie zejména v případě, že by vláčky tvořily spermie od jednoho samce a příbuznost dvou náhodně vybraných spermií by byla průměrně 50 % (Immler et al. 2007). Pro některé spermie by mohlo být výhodné se připojit k vláčku spermií jiného samce. U promiskuitních druhů se však zdá, že spermie spolupracují a přednostně vytvářejí shluky spermií pocházející od jednoho samce (Fisher et Hoekstra 2010).



Obr. 3. Část shluku (vláčku) spermií myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*). Spermie se můžou vzájemně zapojovat apikálními háčky (hvězdička) nebo se háčkem zapojí za bičík (šipka). Převzato z Moor et al. (2002), měřítko 5 μ m.

1.4. Environmentální vlivy na spermie

Živočichové jsou vystaveni celé řadě faktorů a látek z vnějšího prostředí, které mohou působit letálně nebo do značné míry působit negativně na fyziologii. Např. celá řada pesticidů (v poslední době zejména diazinon) snižuje plodnost, působí negativně na ontogenetický vývoj či přímo zvyšuje mortalitu juvenilních stádií i u těch skupin, na které by pesticid neměl působit (Sparling et al. 2001, Relyea 2004, Piha et al. 2006, Sparling et Fellers 2007). V souvislosti s výzkumem příčin klesající plodnosti lidské populace se pozornost zaměřuje právě na látky, které plodnost ovlivňují. Takovými látkami mohou být i fluoridy a fluorohlinitanové komplexy.

Zvýšený pravidelný příjem fluoridů může mít potenciální negativní dopad na plodnost žen (Darmani et al. 2001, Chinoy et Patel 2001) i mužů, dále může ovlivnit spermatogenezi, morfologii spermií a jejich motilitu a schopnost oplození (Chinoy et Narayana 1994, Narayana et Chinoy 1994, Kumar et Susheela 1995, Ghosh et al. 2002, Ortiz-Pérez et al. 2003, Pushpalatha et al. 2005).

Ve fyziologických dávkách jsou fluoridy a fluorohlinitanové komplexy důležité pro zdravý vývoj organismu (WHO 1987, WHO 1997). Zvýšený příjem fluoridů může vzniknout díky fluoridaci vody a soli, používání zubní pasty a užívání potravinových doplňků a některých léků (NHDS, 2006). Stopové množství hliníku je přijímáno potravou z obilovin a z čaje (WHO 1997). Fluorohlinitanové komplexy mohou ovlivňovat funkci G-proteinů (Sternweis et Gilman 1982, Kleuss et al. 1994). G-proteiny jsou zapojeny do mnoha biologických signálních systémů, včetně kapacitace. Kapacitace savčích spermií je

komplex událostí nutných k tomu, aby spermie získaly schopnost oplození (Naz et Rajesh 2004, Visconti et al. 1995 a, Visconti et al. 1995 b).

2. Cíle

1. Kompetice spermií

Cílem práce bylo studium reprodukčních strategií hlodavců na úrovni spermií a to na základě morfologických a behaviorálních vlastností spermií.

Při sledování vlivu kompetice spermií na morfologii spermií bylo cílem zjistit, zda druhy s vyšší mírou kompetice spermií mají delší apikální háčky a bičíky spermií a nižší variabilitu v délkách těchto znaků než druhy s nižší mírou kompetice spermií.

Na odlišné strategie spermií různých druhů hlodavců by mohl ukazovat různý průběh změn v morfologii spermií během konečné fáze spermiogeneze a fáze před oplozením vajíčka. Cílem bylo zjistit, zda jsou úhel zahnutí a délka apikálních háčků konstantní nebo se mění.

2. Environmentální vlivy na spermie

Cílem bylo zjistit působení fluoridových iontů a fluorohlinitanových komplexů na spermatogenezi a na kvalitu spermií savců (laboratorních myší). Zmiňované ionty se vyskytují v látkách přítomných v životním prostředí.

3. Výsledky a diskuse

1. Působení kompetice spermií na variabilitu v délkách apikálních háčků a bičků

Šandera M., Albrecht T., Stopka P., 2011: Variation in apical hook length reflects the intensity of post-copulatory sperm competition in murine rodents. Submitted to Evolutionary Ecology.

Výsledky

Šest druhů myšovitých hlodavců (*Apodemus agrarius*, *A. flavicollis*, *A. microps*, *A. sylvaticus*, *Mus domesticus* a *M. musculus*) bylo použito pro analýzu působení kompetice spermií na variabilitu v délkách apikálních háčků a bičků. Délky apikálních háčků i délky bičků se výrazně lišily mezi většinou druhů. Při porovnání jednotlivých druhů se v délce háčků nelišily pouze *Mus musculus* a *M. domesticus*. Nejdelší háčky byly u *A. agrarius*, zatímco nejkratší háčky u *M. musculus*. Rozdíly v délkách bičků převažovaly mezi většinou druhů. Rozdíly v délce bičků nebyly pouze mezi *A. flavicollis* a *A. microps* a mezi *M. musculus* a *M. domesticus*. Nejdelší bičky byly naměřeny u *A. agrarius*, zatímco nejkratší u *M. domesticus*.

Variační koeficienty ukázaly celkově nízkou variabilitu v délce bičků. Výrazně vyšší rozdíly byly mezi variačními koeficienty délek apikálních háčků. Nejvíce variabilní byly délky háčků u *M. domesticus*, nejméně variabilní u *A. agrarius* (CV_{bm}; between-male variační koeficient) a u *A. sylvaticus* (CV_{wm}; within-male variační koeficient). Spermie *M. musculus* byly nejvariabilnější v délkách bičků, zatímco nejméně proměnlivé délky bičků byly u spermií *M. domesticus*.

Relativní hmotnost varlat se výrazně lišila mezi rody i druhy. Rozdíly nebyly zjištěny mezi *A. agrarius* a *A. sylvaticus*, mezi *A. flavicollis* a *A. microps* a mezi *M. musculus* a *M. domesticus*. Nejvyšší relativní hmotnosti varlat byly u *A. sylvaticus* a u *A. agrarius*, nejnižší u *M. musculus* a *M. domesticus*.

Relativní hmotnost varlat byla pozitivně korelována s průměrnou délkou apikálních háčků a negativně korelována s variabilitou délky háčků (variačními koeficienty). Vztah byl

nejsilnější pro délku háčků (vysvětleno 95% variability), silný pro CVwm (90%) a pro CVbm (82%).

Relativní hmotnost varlat byla také pozitivně korelována s průměrnou délkou bičků, avšak tento vztah nebyl statisticky významný a byl fylogeneticky ovlivněný. Vztahy relativní hmotnosti varlat s variačními koeficienty délek bičků byly neprůkazné.

Délka apikálního háčku byla negativně korelována s její variabilitou (CVwm a CVbm), tento vztah byl významný a silný (82% a 90%). Neprůkazný byl vztah mezi délkou bičku a její variabilitou.

Diskuse

Snížená variabilita v délce spermií způsobená vyšší mírou kompetice spermií byla zaznamenána u pěvců (Immler et al. 2008, Kleven et al. 2008, Lifjeld et al. 2010). V naší práci jsme doložili vliv kompetice spermií na morfologii spermií u myšovitých hlodavců. Znak, který je u spermií těchto hlodavců ovlivňován je apikální háček. Vyšší míra kompetice spermií, vyjádřená relativní hmotností varlat, vede ke snížení variability v délce háčků. Analýza také ukázala, že rozdílnost v délce háčků klesá s rostoucí délkou háčků. Potvrdili jsme výsledky předchozích studií na hlodavcích (Immler et al 2007, Šandera et al 2011), že spermie druhů s vyšší mírou kompetice spermií mají delší apikální háčky.

Možný vztah mezi kompeticí spermií a sníženou variabilitou v délce bičků, jak naznačují u hlodavců Breed et al. (2007), nebyl v našich výsledcích potvrzen. Vztah mezi relativní hmotností varlat a délkou bičků byl patrný, avšak nebyl signifikantní a byl ovlivněn fylogenetickým signálem. Tento vztah by mohl podporovat hypotézu, že druhy savců s vyšší mírou kompetice spermií mají delší spermie (Roldan et al. 1992, Breed et Taylor 2000). Nicméně tato hypotéza nebyla potvrzena výsledky analýzy dat získaných z vícero skupin savců (Gage et Freckleton 2003). Vliv kompetice spermií na délku bičků by mohl být různý u různých skupin savců.

Naše analýza nepotvrdila souvislost mezi variabilitou v délce bičků a kompeticí spermií. Variabilita délky bičků byla nízká obecně u všech studovaných druhů. To může naznačovat, že i u myši je míra kompetice spermií natolik významná, že ovlivňuje proměnlivost délky bičků. Myši ve srovnání s myšicemi mají menší varlata a asi dvakrát až třikrát nižší míru násobného otcovství (multiple paternity) (Bryja et al. 2008), avšak procento

násobného otcovství u *M. domesticus*, 23% (Dean et al. 2006) a 26% (Firman et Simmons 2008), naznačuje určitou míru promiskuity i u myší.

Morfologie spermií by měla ukazovat na různé strategie spermií v kooperaci spermií. Naše výsledky jsou v souladu s popsaným chováním spermií. Spermie *A. sylvaticus* tvoří shluky (vláčky), které se pohybují rychleji než jednotlivé spermie (Moor et al 2002; Immler et al 2007), zatímco u myši jsou vláčky pomalejší než jednotlivé spermie (Immler et al 2007). Postkopulační sexuální výběr je zřejmě silnější u myšic. Usměrnující výběr může působit na prodlužování apikálních háčků a zároveň stabilizující výběr může snižovat rozdíly v délce háčků. Myšice produkují „dokonalejší“ spermie, které mají delší a délkou shodnější apikální háčky, a proto jejich spermie vytvářejí „dokonalejší“ (rychlejší a účinnější) vláčky. Kdežto myší spermie mají kratší a různě dlouhé háčky, takže tvoří méně efektivní vláčky.

Různé variability v délce apikálních háčků u myšic a myší se shodují s různými průběhy akrozomální reakce (Johnson et al. 2007) a s tím souvisejícím zjištěním, že na spermiích myšic není exprimován membránový protein CD46 (Johnson et al. 2007, Clift et al. 2009 a, Clift et al. 2009 b). Zrychlený nástup akrozomální reakce u myšic umožňující dřívější oplození se jeví jako výhodná strategie v kompetici spermií u promiskuitních druhů (Johnson et al 2007). Spermie myšic mohou být chráněny před působením komplementu v samičím pohlavním ústrojí jinými regulačními proteiny komplementu, CD55 a CD59 (Clift et al. 2009 b).

A. agrarius a *A. sylvaticus* mohou být považovány za druhy s vysokou mírou kompetice spermií a s vysokou mírou promiskuity. Na tuto skutečnost poukazují námi zjištěná velká relativní hmotnost varlat, spermie s dlouhými apikálními háčky, dlouhými bičíky a nejmenší variabilitou v délce apikálních háčků a publikované údaje o relativní velikosti varlat a násobném otcovství (Bryja et al. 2008). *A. flavicollis* a *A. microps* mohou představovat druhou úroveň míry kompetice spermií. Ve srovnání s předchozími dvěma druhy, měly spermie s kratšími háčky a vyšší odchylky (CVwm) v délce háčků. Překvapivě bičíky spermií u *A. flavicollis* a *A. microps* byly v průměru kratší než u myší, ale relativní hmotnosti varlat a publikované údaje o násobném otcovství (Bryja a Stopka 2005, Bryja et al 2008) ukazují na vyšší míru kompetice spermií u těchto dvou druhů myšic.

Mezi *M. domesticus* a *M. musculus* nebyly zaznamenány významné rozdíly v délce háčků, délce bičíků a relativní hmotnosti varlat. Avšak v průměru o něco těžší varlata a delší

háčky spermií byly u *M. domesticus*, zatímco delší bičíky spermií u *M. musculus*. Ačkoli variabilita v délce háčků byla u obou druhů obdobná, variabilita v délce bičků byla odlišná. Ze všech sledovaných druhů spermie *M. musculus* měly nejvíce variabilní délku bičků, zatímco spermie *M. domesticus* měly variabilitu v délce bičků nejmenší.

Došli jsme k závěru, že kompetice spermií u hlodavců ovlivňuje hlavně apikálních háčků a stabilizující výběr způsobuje snížení variability v délce háčků u druhů s vyšší mírou kompetice spermií. Oba variační koeficienty (CV_{wm} a CV_{bm}) mají velký potenciál pro využití v dalším studiu kompetice spermií u různých živočišných skupin.

2. Změny pozic zahnutí apikálních háčků spermií

Šandera M., Andrlíková P., Frolíková M., Stopka P., 2011: Changes in the curvature of sperm apical hooks in murine rodents. *Biologia*: in press.

Výsledky

Zjistili jsme odlišné strategie spermií u myši (*Mus musculus*) a myšic (*Apodemus agrarius* a *A. sylvaticus*), rozdílný průběh změn úhlů zahnutí apikálních háčků ve finálním dozrávání spermií a před oplozením. Výsledky ukázaly, že zahnutí apikálního háčku se významně mění po uvolnění spermií z *epididymis* a po proděláním akrozomální reakce. Navíc u myšic a myši změny probíhaly odlišně (zatímco u myšic zahnutí vzrůstalo, u myši přechodně kleslo). U myšic byl nápadný nárůst zahnutí apikálních háčků mezi spermii před (stádium 0) a po uvolnění z *epididymis* (1), po spontánní akrozomální reakci (2) nebyl pokles významný. Kdežto u myši byl průběh zahnutí opačný. Mezi spermii před (0) a po uvolnění (1) z *epididymis* docházelo k mírnému poklesu zahnutí apikálních háčků, po spontánní akrozomální reakci (2) se háčky opět více zahnulý. Zjištěno bylo značné rozpětí hodnot úhlů zahnutí apikálních háčků u všech druhů ve všech třech stádiích. Dále bylo zjištěno, že délky apikálních háčků zůstávají mezi jednotlivými stádii bez výrazných změn.

Diskuse

Výsledky ukázaly, že spermie druhů s vyšší mírou kompetice spermií prodělávají větší změny. Změny zahnutí apikálních háčků nastávají u spermií zejména po uvolnění z nadvarlete, přirozeně po ejakulaci. Míra zahnutí háčků související s mírou kompetice je ve shodě s výsledky Immler et al. (2007), avšak tito autoři měřili od jednoho druhu jen 5 spermií jen jednoho samce. To je značně malý počet spermií. Navíc měřili spermie pouze v jednom, metodicky přesně nedefinovaném, stádiu. Hodnoty úhlů uvedené ve zmiňovaném článku nasvědčují tomu, že se jednalo o aktivované spermie uvolněné z *cauda epididymidis*.

U myšic byl u dormantních spermií (0) největší rozsah a zároveň nejmenší zahnutí. Nejmenší rozsah hodnot úhlů a zároveň největší zahnutí po uvolnění spermií myšic ukazuje na to, že u druhů s dlouhým apikálním háčkem se háček při pohybu přimkne (přiblíží) k ventrální části hlavičky. Tím pádem se zvýší úhel zahnutí háčku. Pro zapojení do shluků (vláček) je důležité, aby pozice háčku nebyla zcela fixní (háček zůstal flexibilní). To koresponduje s naším zjištěním, že se úhel měnil po prodělání akrozomální reakce.

V nadvarletí mohou být pozice háčků různé a úhly zahnutí u myšic nejmenší, protože spermie se samostatně nepohybují. Jakmile se spermie uvolní nebo jsou přirozeně ejakulovány, pak je v prvních chvílích (dokud spermie plavou samostatně) z hydrodynamického hlediska výhodnější mít dlouhý háček přimknutý. Posléze při shlukování je potřeba, aby byl háček ohebný.

U myši nebyly rozdíly v zahnutí úhlu statisticky významné, avšak nejmenší zahnutí bylo u spermií po uvolnění (aktivních spermií), tedy průběh zahnutí byl opačný než u myšic. Nejmenší zahnutí u aktivních spermií vysvětlujeme tím, že myš má výrazně kratší apikální háček, který je méně ohebný. V nadvarletí nejspíš dochází díky nedostatku místa k mírnému přimknutí, po uvolnění se háček dostane do své přirozené pozice a po zreagování spermie se uvolní. Nasvědčují tomu i rozsahy zahnutí, kdy u dormantních a aktivních spermií byly rozsahy menší než u zreagovaných spermií.

Pro vytváření zapojených shluků (vláček) je u spermií důležitá přítomnost apikálních háčků (Moor et al. 2002, Immler et al. 2007). Pro vytváření vláček, které mají představovat výhodnou strategii, je důležitá nejen přítomnost apikálních háčků, ale záleží i na délce a ohebnosti háčků – schopnosti se zapojovat. Protáhlé vláčky plavou rychleji než samotná spermie. Potvrzeno to bylo u *A. sylvaticus* (Moor et al. 2002). U myšic se tak v kompetici

spermií jeví jako výhodná strategie kooperace spermií v podobě zapojování se do vláček. A to i z hlediska samotné spermie, která se zapojením do vláčku „obětuje“, vajíčko nejspíš neoplodní, ale pomůže shluku v pohybu směrem k vajíčku (Moor et al. 2002). Výhoda platí v případech, že shluk vytvářejí spermie jednoho samce a tedy že příbuznost spermií je průměrně 50 % (Immler et al. 2007, Immler 2008). Z hlediska časoprostorového je předpoklad vytváření shluků spermiemi jednoho samce pravděpodobnější než vytváření smíšených shluků spermiemi dvou či více samců. U myšic tak nejspíš budou kompetovat jednotlivé shluky mezi sebou. Shluk od jednoho samce musí dohnat časovou ztrátu na shluk předchozího samce. Vysoké procento násobného otcovství (multiple paternity) u myšic (Bryja et al. 2008) této strategii nasvědčuje. U druhu s vyšší mírou promiskuity, tzn. druhu, kde samec nemůže uhlídat po páření samici, je výhodné mít kooperující spermie, které mají dlouhý apikální háček a které vytvářejí vláčky. Tyto druhy mají i delší bičíky (Breed 2005) a relativně větší varlata (Roldan et al. 1992, Breed et Taylor 2000).

Shluky myších spermií však plavaly pomaleji než samotná spermie (Immler et al. 2007). Spermie myši vytvářejí spíše širší shluky. U myši se jeví vytváření shluků spermií jako nevýhodné. Menší míra násobného otcovství ukazuje na to, že samci si ohlídnou samice snáze než u myšic. Ale ne vždy. O určité míře promiskuity samic svědčí zjištěné hodnoty násobného otcovství u *Mus domesticus* 23 % ze zkoumaných případů a odhadovaná frekvence byla při nejmenším 20 % (Dean et al. 2006). Pomalý shluk spermií pak může sloužit jako „lákadlo (návnada)“ pro spermie druhého samce, zatímco jednotlivé spermie prvního samce putují k vajíčku. Z hlediska samotné spermie je tato strategie výhodnější než být součástí shluku.

Jestliže je apikální háček a u myšovitých hlodavců ancestrální stav a jeho nepřítomnost je odvozená (Breed 2004, Breed 2005), pak utváření spermií a s tím související uspořádání párovacího systému mohlo mít různé trendy. První je tendence k monoandrii (monogamii), ohlídnutí si samic, zkrácení až vymizení apikálního háčku, např. spermie *Micromys minutus* nemají apikální háčky (Breed 2004), kdy není potřeba investovat do tvorby nákladnějších spermií. Druhou je tendence k promiskuitě, kdy se vyplatí mít nákladnější (složitější) spermie, a kdy samci neztrácejí čas a síly s hlídáním samic, např. *Apodemus agrarius* a *A. sylvaticus*. U většiny druhů se však nejspíše uplatňují různé párovací systémy v různých aktuálních podmínkách v závislosti na hustotě populací. Forma kompetice spermií není tak vyhraněná a neuplatní se tolik tendence k mizení nebo naopak prodlužování apikálních háčků. Mezi takové

druhy by šlo zařadit druh *Apodemus microps* (*A. uralensis*), u kterého bylo zjištěno různé procento násobného otcovství v různém období roku (jaro 12,5 %, léto 43,8 %) (Bryja et Stopka 2005). Nebo *Rattus norvegicus*. U potkana bylo zjištěno, že shluky spermií se stejně jako u *A. sylvaticus* pohybují rychleji než samotná spermie, ale zahnutí apikálních háčků je výrazně menší než u *A. sylvaticus*, odpovídá zahnutí u myši (Immler 2007). Druhy obecně nebude nejspíš možné striktně dělit do kategorií. U myši se mohla projevit tendence k monoandrii, ale vzhledem k určité frekvenci násobného otcovství zůstává spíše promiskuitní.

Spermie *A. agrarius* vykazovaly větší výkyvy průměrných hodnot zahnutí apikálního háčku než u *A. sylvaticus*. Vykazovaly i větší rozsahy, kromě aktivních spermií, kde naopak rozsah byl úplně nejmenší. Spermie *A. agrarius* měly zároveň vyšší průměr délky apikálních háčků než *A. sylvaticus*. Podobně u *A. agrarius* bylo zjištěno o něco málo vyšší procento násobného otcovství (multiple paternity; během vrcholu vegetační sezóny): *A. agrarius* 69,2 %, *A. sylvaticus* 68,8 % (Bryja et al. 2008).

Délky háčků se u jednotlivých druhů v jednotlivých stádiích neměnily. Byl zaznamenán nepatrný pokles v délkách v průběhu stádií spermií. Vysvětlit tento jev lze „opotrebováním“ apikálního háčku u aktivních spermií stahováním aktinových vláken cytoskeletu háčku. Malý úbytek délky u spermií po spontánní akrozomální reakci může způsobit akrozomální reakce, resp. lytické enzymy akrozomu. Chyba měření vzhledem k celkovému počtu měřených spermií se jeví jako méně pravděpodobná.

Měření délky apikálních háčků je pro výzkum kompetice spermií vhodné a postačující. Měření úhlů zahnutí apikálních háčků je pro účely výzkumu kompetice spermií z metodického hlediska nepraktické. Změny a velké rozsahy hodnot zahnutí v jednotlivých stádiích jsou samy o sobě velice zajímavé a představují možné téma pro cílené studie.

Kvalitu spermií a jejich životaschopnost mohou ovlivňovat negativní dopady různých látek v životním prostředí (Dvořáková-Hortová et al. 2008), může tak být ovlivněno i formování apikálních háčků. Na výsledné podobě spermie se mohou podepsat i sociobiologické vlivy v průběhu spermatogeneze (Frynta et al. 2009, Ramm et Stockley 2009). Přes všechny tyto možné vlivy a přesto, že další výzkum změn zahnutí apikálních háčků u dalších druhů by byl přínosný, ukázaly naše výsledky jasně na rozdílné strategie spermií u myšovitých a na význam délky a flexibility apikálních háčků v kompetici spermií hlodavců.

3. Vliv fluoridů na kapacitaci myších spermií

Dvořáková-Hortová K., Šandera M., Jursová M., Vašinová J., Pěkníková J., 2008: The influence of fluorides on mouse sperm capacitation. *Animal Reproduction Science* 108 (1-2): 157 – 170.

Výsledky

Zjistili jsme, že vystavení myší zvýšené koncentraci fluoridů a fluorohlinitanových komplexů v pitné vodě má za následek snížení úrovně spermatogeneze a kvalitativně postihuje testikulární tkáň. Působení iontů mělo za následek pokles počtu spermií schopných tyrozinové fosforylace a aktinové polymerace v průběhu kapacitace *in vitro*. Výsledky ukázaly, že působení iontů *in vivo* ovlivnilo následně schopnost spermií kapacitovat *in vitro*. Tyto ionty mohou představovat potenciální riziko vedoucí ke snížení plodnosti a mohou ovlivňovat celkovou fertilizační schopnost spermií.

Diskuse

Tyrozinová fosforylace a aktinová polymerace byly sledovány jako markery kvality kapacitace spermií, reflektující schopnost spermií projít kapacitací a následně akrozomální reakcí. G-proteiny se aktivně účastní těchto procesů a vzhledem k jejich možnosti modifikované aktivity díky vazbě fluorohlinitanových komplexů bylo hodnocení míry tyrozinové fosforylace pro kapacitaci specifických proteinů relevantní. Experimentální zvířata fenotypově nevykazovala znatelné fyziologické změny a nebyla zaznamenána zvýšená mortalita mláďat. Abnormality byly prokázány histologickou analýzou varlat ve skupinách s nejvyšší koncentrací fluoridů (A3) a (B3). Fluoridy mohou ovlivňovat funkci G-proteinů (Chabre 1990). Tyto proteiny jsou důležité při uvolňování testosteronu z Leydigových buněk prostřednictvím interakce luteinizačního hormonu s G-proteinovými receptory (Payne et O'Shaughnessy 1996). G-proteiny (proteinová signalizace) jsou rovněž důležité pro činnost Sertoliho buněk a zásadní pro spermatogenezi (Richburg et al. 2002) včetně následné maturace spermií a kapacitace. V konečném důsledku mohou ionty fluoridu a hliníku narušovat fertilizační schopnost spermií v jednotlivých stádiích spermatogeneze a maturace.

Výsledky studie na potkanech ukázaly negativní vliv fluoridů na kompaktnost varlat a míru spermatogeneze, jakož i koncentraci a kvalitu spermií, a to již při koncentraci 4,5 a 9 ppm (Pushpalatha et al. 2005). U experimentálních skupin jsme nepozorovali rozdíly v pohyblivosti nebo životaschopnosti spermií, významný pokles byl zaznamenán v koncentraci spermií u skupin A3 (100 ppm fluoridových iontů + 0 ppm hliníkových), B2 (10 + 10) a B3 (100 + 10) a v relativní váze varlat u skupin A3 a B2. Tedy u skupin s vyššími koncentracemi iontů. Podobné výsledky na potkanech zaznamenali Ghosh et al. (2002). Skupina A1, s fyziologickou koncentrací 1 ppm fluoridu v pitné vodě, vykázala nejvyšší koncentraci spermií a relativní hmotnost varlat.

Tyrosinová fosforylace specifických proteinů při kapacitaci je zásadní pro schopnost spermií projít akrozomální reakcí po interakci se *zona pellucida* (Naz et al. 1991). Výsledky ukázaly výrazný pokles tyrosinové fosforylace u skupin A2, 3 a B1-3, což je podstatné, neboť při působení iontů *in vivo* toto může představovat až o 50% méně spermií (skupina B3), které jsou skutečně schopny oplodnit vajíčko.

U skupin (A2, 3 a B1-3) s vyššími koncentracemi iontů došlo současně k poklesu aktinové polymerace, která je zcela závislá na míře tyrosinové fosforylace a reflektuje aktivitu signálních drah v průběhu kapacitace spermií. Obecně výsledky vyšly pro skupiny A2 a A3 podobně s výsledky B1 a B2. Posun by mohl být vysvětlen efektem synergického působení fluoridů a hliníku vytvářením fluorohlinitanových komplexů (Coggeshall et al. 1989) nebo přeměnou anorganických fluoridů do organické fluoru (Dong et al. 2004). Nelze opomenout, že skupiny A přijímaly stopové množství hliníku v potravě, výsledky však vyšly různé pro skupiny A1 a B1.

Komplexy fluoridu hlinitého mohou simulovat GTP-vazebné proteiny a mohou modifikovat aktivaci spermií a následně vyvolat zvýšenou akrozomální reakci (Dominguez et al. 1995). Naše výsledky nepotvrdily žádné statisticky významné hodnoty při ionoforem indukované akrozomální reakci. Během 180 min kapacitace *in vitro* nedocházelo ve zvýšené míře k lýzi akrozómů, což bylo prokázáno i na základě aktinové polymerace shodné s již publikovanými výsledky (Brener et al. 2003).

4. Seznam publikací

1. **Šandera M.**, Albrecht T., Stopka P., 2011: Variation in apical hook length reflects the intensity of post-copulatory sperm competition in murine rodents. Submitted to *Evolutionary Ecology*.
2. **Šandera M.**, Andrlíková P., Frolíková M., Stopka P., 2011: Changes in the curvature of sperm apical hooks in murine rodents. *Biologia*: in press.
3. Dvořáková-Hortová K., **Šandera M.**, Jursová M., Vašinová J., Pěkníková J., 2008: The influence of fluorides on mouse sperm capacitation. *Animal Reproduction Science* 108 (1-2): 157 – 170.

Přiložená publikace:

Stopková R., Zdráhal Z., Ryba Š., Šedo O., **Šandera M.**, Stopka P., 2010: Novel OBP genes similar to hamster Aphrodisin in the bank vole, *Myodes glareolus*. *BMC Genomics* 11:45.

5. Závěry

1. Kompetice spermií

Morfologie spermií hlodavců hraje důležitou roli v kompetici spermií. Morfologie spermií ukazuje na různé strategie spermií spočívající v odlišně efektivním shlukování spermií (vytváření vláček). Delší bičíky a apikální háčky spermií jsou u druhů s relativně většími varlaty a s vyšším procentem násobného otcovství (multiple paternity), tedy u druhů s vyšší mírou promiskuity a vyšší mírou kompetice spermií. Různé strategie spermií se projevují i v přítomnosti nebo absenci některých proteinů na spermiích.

Druhy hlodavců s vyšší mírou kompetice spermií mají delší apikální háčky spermií, zároveň však méně variabilní délky apikálních háčků než druhy s menší mírou kompetice spermií. Usměrnující výběr zřejmě působí na prodlužování apikálních háčků a stabilizující výběr zároveň na variabilitu délek apikálních háčků.

Různé strategie spermií se projevují i v rozdílném průběh změn zahnutí apikálních háčků ve finálním dozrávání spermií a před oplozením. V každém stádiu (stavu) u všech druhů je značné rozpětí hodnot úhlů zahnutí apikálních háčků. Délky apikálních háčků zůstávají mezi jednotlivými stavy spermií bez výrazných změn. Z tohoto pohledu se jeví měření úhlů zahnutí apikálních háčků, v metodicky nedefinovaném stavu spermie, jako nevhodné pro zjišťování míry kompetice spermií. Vhodnější je měření délky apikálních háčků. Délka a ohebnost apikálních háčků jsou významné pro kompetici spermií.

2. Environmentální vlivy na spermie

Civilizační rozvoj s sebou přináší i lidské činnosti, při kterých se do životního prostředí dostávají látky, které pak ovlivňují ekosystémy i jednotlivé neživé i živé složky prostředí včetně člověka samotného. Některé látky působí toxicky přímo samotné, jiné působí toxicky až v součinnosti s dalšími látkami. Negativní působení na živočichy spočívá ve zvýšení

mortality, snížení plodnosti (ovlivnění spermatogeneze a fyziologie spermií) a ovlivnění celkové fyziologie organismu. Fluoridy a fluorohlinitanové komplexy, přítomné v životním prostředí, můžou představovat potenciální riziko vedoucí ke snížení plodnosti obou pohlaví a mohou ovlivňovat celkovou fertilizační schopnost spermií.

6. Literatura

Austin C. R., 1951: Observation on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. (B)* 4 (4): 581 – 596.

Baskevich M. I., Potapov S. G., Okulova N. M., Balakirev A. E., Krapivko T. P., Sapel'nikov S. F., 2004: A comparative analysis of spermatozoa in six mouse species of the genus *Apodemus* (Rodentia, Muridae) from Eastern Europe and Transcaucasia (Russian; English abstract). *Zoologicheskyy Zhurnal* 83 (6): 725 – 732.

Bedford J. M., Hoskins D. D., 1990: The spermatozoon: morphology, physiology and biochemistry. In: Lamming G. E. (ed.): *Marshall's physiology of reproduction. The male reproductive system. Vol. 2.* London: Churchill Livingstone: 379 – 568.

Berndtson W. E., Igboeli G., Pickett B. W., 1987: Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. *J. Anim. Sci.* 64: 241 – 246.

Breed W. G., 2004: The Spermatozoon of Eurasian Murine Rodents: Its Morphological Diversity and Evolution. *Journal of Morphology* 261: 52 – 69.

Breed W. G., 2005: Evolution of the Spermatozoon in Muroid Rodents. *Journal of Morphology* 265: 271 – 290.

Breed W. G., Taylor J., 2000: Body mass, testes mass, and sperm size in murine rodents. *Journal of Mammalogy* 81(3): 758 – 768.

Brener E., Rubinstein S., Cohen G., Shternall K., Rivlin J., Breitbart H., 2003: Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 68: 837 – 845.

Bryja J., Stopka P., 2005: Facultative promiscuity in a presumably monogamous mouse *Apodemus microps*. *Acta Theriologica* 50 (2): 189 – 196.

Bryja J., Patzenhauerová H., Albrecht T., Mošanský L., Stanko M., Stopka P., 2008: Varying levels of female promiscuity in four *Apodemus* mice species. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 63: 251 – 260.

Bustos-Obregon E., Courot M., Flechon J. E., Hochereau-de-Reviere M. T., Holstein A. F., 1975: Morphological appraisal of gametogenesis. Spermatogenetic process in mammals with particular reference to man. *Andrologia*; 7: 141 – 163.

Calhim S., Immler S., Birkhead T. R., 2007: Postcopulatory Sexual Selection Is Associated with Reduced Variation in Sperm Morphology. *PloS ONE* 2 (5): e413.
doi:10.1371/journal.pone.0000413

Clift L. E., Andrlíková P., Frolíková M., Stopka P., Bryja J., Flanagan B. F., Johnson P. M., Dvořáková-Hortová K., 2009 a: Absence of spermatozoal CD46 protein expression and associated rapid acrosome reaction rate in striped field mice (*Apodemus agrarius*). *Reprod. Biol. Endo.* 7: 29. doi:10.1186/1477-7827-7-29

Clift L. E., Dvořáková-Hortová K., Frolíková M., Andrlíková P., Salman S., Stopka P., Flanagan B. F., Johnson P. M., 2009 b: CD55 and CD59 protein expression by *Apodemus* (field mice) sperm in the absence of CD46. *Journal of Reproductive Immunology* 81: 62 – 73.

Coggeshall K.M., Altman A., 1989: Stimulation of PIP2 hydrolysis by aluminum fluoride in resting T cell subsets of normal and autoimmune-prone lpr mice. *J. Immunol.* 143 (3): 780 – 786.

Darmani H., Al-Hiyasat A. S., Elbetieha A. M., 2001: Effects of sodium fluoride in drinking water on fertility in female mice. *Fluoride* 34 (4): 242–249.

Dean M. D., Ardlie K. G., Nachman M. W., 2006: The frequency of multiple paternity suggests that sperm competition is common in house mice (*Mus domesticus*). *Molecular Ecology* 15: 4141 – 4151.

delBarco-Trillo J., Ferkin M. H., 2004: Male mammals respond to a risk of sperm competition conveyed by odours of conspecific males. *Nature* 431: 446 – 449.

Dominguez L., Diaz A., Fornes M.W., Mayorga L.S., 1995: Reagents that activate GTP-binding proteins trigger the acrosome reaction in human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 18 (4): 203 – 207.

Dong C., Huang F., Deng H., Schaffrath Ch., Spencer J.B., O'Hagan D., Naismith J.H., 2004: Crystal structure and mechanism of a bacterial fluorinating enzyme. *Nature* 427: 561 – 565.

Dvořáková-Hortová K., Šandera M., Jursová M., Vašinová J., Pěkníková J., 2008: The influence of fluorides on mouse sperm capacitation. *Animal Reproduction Science* 108 (1-2): 157 – 170.

Fawcett D. W., 1975: The mammalian spermatozoon. *Dev. Biol.* 44: 394 – 436.

Firman R. C., Simmons L. W., 2008: The frequency of multiple paternity predicts variation in testes size among island populations of house mice. *Journal of Evolutionary Biology* 21 (6): 1524 – 1533.

Fisher H. S., Hoekstra H. E., 2010: Competition drives cooperation among closely related sperm of deer mice. *Nature* 463: 801 – 803. doi:10.1038/nature08736

Frynta D., Slábová M., Vohralík V., 2009: Why do male house mice have such small testes? *Zoological science* 26 (1): 17 – 23.

- Gage M. J. G., Freckleton R. P., 2003: Relative testis size and sperm morphometry across mammals: no evidence for an association between sperm competition and sperm length. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 625 – 632. doi: 10.1098/rspb.2002.2258
- Ghosh D., Das S., Maiti R., Jana D., Das U. B., 2002: Testicular toxicity in sodium fluoride treated rats: association with oxidative stress. *Reprod. Toxicol.* 16: 385 – 390.
- Gomendio M., Harcourt A. H., Roldán E. R. S., 1998: Sperm Competition in Mammals. In: Birkhead T. R. et Møller A. P.: *Sperm Competition and Sexual Selection*. Academic Press: 667 – 755.
- Harcourt A. H., Harvey P. H., Larson S. G., Short R. V., 1981: Testes weight, body weight and breeding system in primates. *Nature* 293: 55 – 57.
- Chabre M., 1990: Aluminofluoride and beryllifluoride complexes: a new phosphate analogs in enzymology. *Trends Biochem. Sci.* 15 (1): 6–10.
- Chang M. C., 1951: Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168: 697 – 698.
- Chinoy N. J., Narayana M. V., 1994: In vitro fluoride toxicity in human spermatozoa. *Reprod. Toxicol.* 8 (2): 155–159.
- Chinoy N. J., Patel T. N., 2001: Effects of sodium fluoride and aluminium chloride on ovary and uterus of mice and their reversal by some antidotes. *Fluoride* 34 (1): 9–20.
- Immler S., 2008: Sperm competition and sperm cooperation: the potential role of diploid and haploid expression. *Reproduction* 135: 275 – 283.
- Immler S., Birkhead T. R., 2007: Sperm competition and sperm midpiece size: no consistent pattern in passerine birds. *Proc. R. Soc. B* 274: 561 – 568. doi:10.1098/rspb.2006.3752
- Immler S., Moore H. D. M., Breed W. G., Birkhead T. R., 2007: By Hook or by Crook? Morphometry, Competition and Cooperation in Rodent Sperm. *PloS ONE* 2 (1): e170. doi:10.1371/journal.pone.0000170
- Immler S., Calhim S., Birkhead T. R., 2008: Increased postcopulatory sexual selection reduces the intramale variation in sperm design. *Evolution* 62:1538 – 1543.
- Inoue N., Ikawa M., Nakanishi T., Matsumoto M., Nomura M., Seya T., Okabe M., 2003: Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Molecular and Cellular Biology* 23: 2614–2622.
- Johnson P. M., Clift L. E., Andrlíková P., Jursová M., Flanagan B. F., Cummerson J. A., Stopka P., Dvořáková-Hortová K., 2007: Rapid sperm acrosome reaction in the absence of acrosomal CD46 expression in promiscuous field mice (*Apodemus*). *Reproduction* 134: 739 – 747.

- Kenagy G. J., Trombulak S. G., 1986: Size and function of mammalian testes in relation to body size. *Journal of Mammalogy* 67: 1 – 22.
- Kleuss C., Raw A. S., Lee E., Sprang S. R., Gilman A. G., 1994: Mechanism of GTP hydrolysis by G-protein α subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 9828–9831.
- Kleven O., Laskemoen T., Fossøy F., Robertson R. J., Lifjeld J. T., 2008: Intraspecific variation in sperm length is negatively related to sperm competition in passerine birds. *Evolution* 62: 494–499.
- Kumar A., Susheela A. K., 1995: Effects of chronic fluoride toxicity on the morphology of ductus epididymis and the maturation of spermatozoa of rabbit. *Int. J. Exp. Pathol.* 76 (1): 1–11.
- Lifjeld J. T., Laskemoen T., Kleven O., Albrecht T., Robertson R. J., 2010: Sperm length variation as a Predictor Extrapair Paternity in Passerine Birds. *PloS ONE* 5 (10): e13456. doi:10.1371/journal.pone.0013456
- Liszewski M. K., Kemper C., Price J. D., Atkinson J. P., 2005: Emerging roles and new functions of CD46. *Springer Seminars in Immunopathology* 27: 345–358.
- Montoto L. G., Magaña C., Tourmente M., Martín-Coello J., Crespo C., Luque-Larena J. J., Gomendio M., Roldan E. R. S., 2011: Sperm Competition, Sperm Numbers and Sperm Quality in Muroid Rodents. *PloS ONE* 6 (3): e18173. doi:10.1371/journal.pone.0018173
- Moore H., Dvořáková K., Jenkins N., Breed W., 2002: Exceptional sperm cooperation in the wood mouse. *Nature* 418: 174 – 177.
- Narayana M. V., Chinoy N. J., 1994: Reversible effects of sodium fluoride ingestion on spermatozoa of the rat. *Int. J. Fertil. Menopausal Stud.* 39 (6): 337–346.
- Naz R. K., Rajesh P. B., 2004: Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2: 75.
- Naz R. K., Ahmad K., Kumar R., 1991: Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoal function. *J. Cell. Sci.* 99 (Pt I): 157 – 165.
- NHDS 2006: New Hampshire Department of Environmental Services. Fluoride: Health Information Summary. <http://www.des.state.nh.us/factsheets/ehp/inc/14.html>.
- Ortiz-Pérez D., Rodríguez-Martínez M., Martínez F., Borja-Aburto V. H., Castelo J., Grimaldo J. I., de la Cruz E., Carrizales L., Díaz-Barriga F., 2003: Fluoride-induced disruption of reproductive hormones in men. *Environ. Res.* 93: 20–30.
- Payne A. H., O’Shaughnessy P. L., 1996: Structure, function and regulation of steroidogenic enzymes in the Leydig cell. In: Payne A., Hardy M., Ruccell L. (Eds.): *The Leydig Cell*. Cache River Press, Viena: 259 – 285.

- Piha H., Pekkonen M., Merilä J., 2006: Morphological Abnormalities in Amphibians in Agricultural Habitats: A Case Study of the Common Frog *Rana temporaria*. *Copeia* 2006 (4): 810 – 817.
- Pushpalatha T., Srinivas M., Sreenivasula Reddy P., 2005: Exposure to high fluoride concentration in drinking water will affect spermatogenesis and steroidogenesis in male albino rats. *Biometals* 18: 207 – 212.
- Ramm S. A., Stockley P., 2007: Ejaculate allocation under varying sperm competition risk in the house mouse, *Mus musculus domesticus*. *Behavioral Ecology* 18 (2): 491 – 495.
- Ramm S. A., Stockley P., 2009: Adaptive plasticity of mammalian sperm production in response to social experience. *Proceedings. Biological sciences* 276(1657): 745 – 751.
- Relyea R. A., 2004: Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (7): 1737 – 1742.
- Richburg J. H., Nanez A., Williams L. R., Embree M. E., Boekelheide K., 2002: Sensitivity of testicular germ cells to toxicant-induced apoptosis in gld mice that express a nonfunctional form of Fas ligand. *Endocrinology* 141 (2): 787 – 793.
- Roldan E. R. S., Gomendio M., Vitullo A. D., 1992: The evolution of eutherian spermatozoa and underlying selective forces: female selection and sperm competition. *Biol. Rev.* 67: 551 – 593.
- Russell L. D., Peterson R. N., 1984: Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J. Reprod. Fertil.* 70: 635 – 641.
- Sparling D. W., Fellers G., 2007: Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylei*. *Environmental Pollution* 147: 535 – 539.
- Sparling D. W., Fellers G. M., McConnell L. L., 2001: Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (7): 1591 – 1595.
- Sternweis P. C., Gilman A. G., 1982: Aluminum: a requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluoride. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78 (16): 4888–4891.
- Stopka P., Gracíasová R., 2001: Conditional allogrooming in the herb-field mouse. *Behav. Ecol.* 12: 584 – 589.
- Stopka P., Macdonald D. W., 1998: Signal interchange during mating in the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*): the concept of active and passive signalling. *Behavior* 135: 231 – 249.
- Stopková R., Zdráhal Z., Ryba Š., Šedo O., Šandera M., Stopka P., 2010: Novel OBP genes similar to hamster Aphrodisin in the bank vole, *Myodes glareolus*. *BMC Genomics* 11:45. doi:10.1186/1471-2164-11-45

Šandera M., Andrlíková P., Frolíková M., Stopka P., 2011: Changes in the curvature of sperm apical hooks in murine rodents. *Biologia*: in press.

Šebek Z., 1962: Neuere Artkriterien bei den Mäuseartigen (Fam. Muridae). In: Kratochvíl J. et Pelikán J. (eds.): *Symposium Theriologicum. Proceedings of the International Symposium on Methods of Mammalogical Investigation, Brno 1960*. Praha: Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences: 318 – 325.

Visconti P. E., Bailey J. L., Moore G. D., Dieyun P., Olds-Clarke P., Kopf G. S., 1995 a: Capacitation of mouse spermatozoa I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121: 1129–1137.

Visconti P. E., Moore G. D., Bailey J. L., Pan D., Leclerc P., Connors S. A., Olds-Clarke P., Kopf G. S., 1995 b: Capacitation of mouse spermatozoa II. Capacitacion and protein tyrosine phosphorylation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121: 1139–1150.

WHO, 1987: *Prevention of Oral Diseases*. WHO Offset Publication No. 103. WHO, Geneva, 83 pp.

WHO, 1997: *Aluminium*. International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 194). WHO, Geneva, 282 pp.

7. Publikace

1. Šandera M., Albrecht T., Stopka P., 2011: Variation in apical hook length reflects the intensity of post-copulatory sperm competition in murine rodents. Submitted to *Evolutionary Ecology*.

2. **Šandera M.**, Andrlíková P., Frolíková M., Stopka P., 2011: Changes in the curvature of sperm apical hooks in murine rodents. *Biologia*: in press.

3. Dvořáková-Hortová K., **Šandera M.**, Jursová M., Vašinová J., Pěknicová J., 2008: The influence of fluorides on mouse sperm capacitation. *Animal Reproduction Science* 108 (1-2): 157 – 170.

8. Přílohy

Stopková R., Zdráhal Z., Ryba Š., Šedo O., Šandera M., Stopka P., 2010: Novel OBP genes similar to hamster Aphrodisin in the bank vole, *Myodes glareolus*. BMC Genomics 11:45.



„Je čas skončit“. Myšice lesní (*Apodemus flavicollis*), samec,
lokalita: Slatinná louka u Liblic, 20. 9. 2008, foto: Martin Šandera.