

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství ochrany vod

Diplomová práce

Kryokonzervace spermií kapra obecného (*Cyprinus carpio*) při různých podmínkách zmrazování.

Autor: Bc. Denisa Sochorová

Vedoucí diplomové práce: Sergey Boryspolets, MSc., Ph.D.

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

Studijní program a obor: Zootechnika, Rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 2. Mgr.

České Budějovice 2015

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že, v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 4. 5. 2015

Podpis:.....

Mé poděkování patří především mému školiteli Sergeyi Boryspoletsovi, Msc., Ph.D. za ochotu, trpělivost, cenné rady při tvorbě mé diplomové práce. Mé díky patří Marku Rodinovi, Borysi Dzyubovi, Pavle Linhartové, a ostatním, kteří mi poskytli potřebné informace, pomoc a radu pro vypracování této diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu během studia.

Obsah:

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část	9
2.1	Kapr obecný (Cyprinus carpio)	9
2.1.1	Plemena kapra obecného	9
2.2	Spermie kapra obecného	10
2.2.1	Metabolické procesy.....	11
2.3	Kryokonzervace.....	12
2.3.1	Seeding	12
2.4	Problémy při zmrazování spermií.....	13
2.4.1	Poškození při zmrazování.....	14
2.5	Rychlé zmrazování a rozmrazování	19
2.6	Pomalé zmrazování a rozmrazování	21
2.7	Na kryokonzervaci (zmrazování) mohou mít vliv:.....	21
2.7.1	Vliv rozpuštěných látek (kryoprotektantů).....	21
2.7.2	Osmotické efekty	21
2.7.3	Snížení mechanického stresu.....	21
2.8	Rychlost a způsob rozmrazení spermatu	23
2.9	Hodnocení fertility spermií a oplozování jiker.....	23
3	Experimentální část.....	24
3.1	Materiály a metodika	24
3.1.1	Chov ryb a odběr spermatu.....	24
3.1.2	Hodnocení pohyblivosti spermií.....	24
3.1.3	Kryokonzervace spermatu	25
3.1.4	Statistická analýza	25
3.2	Experimentální schéma.....	26
4	Výsledky	29
5	Diskuze	33
6	Závěr	36
7	Přehled použité literatury	37
8	Zkratky:.....	46
9	Abstrakt.....	47

10 Abstract 48

1 Úvod

Už od pradávna patřil lov ryb k základním způsobům obživy člověka. Postupem času prostý lov přecházel na záměrný chov ryb, který je dlouholetou tradicí českých zemí. Důležitým ukazatelem úspěšného chovu, je správné zvládnutí rozmnožování ryb. V raných začátcích chovu byla používána prostá přirozená reprodukce ryb, která byla zdokonalována přesazováním ryb. Dalším mezníkem v oblasti reprodukce ryb bylo zavedení tzv. poloumělého výtěru, kdy reprodukce probíhala v přirozených podmínkách kontrolovaných člověkem. Důležitým bodem v oblasti technologie reprodukce ryb bylo provedení umělého výtěru a zdokonalení metodického postupu pro různé druhy ryb. V České republice byl uskutečněn první umělý výtěr v roce 1784 u lososa obecného (*Salmo salar*) v Horažďovicích. Mezi posledními propracovanými metodami umělého výtěru patří umělý výtěr bolena dravého (*Aspius aspius*), sumce velkého (*Silurus glanis*), lína obecného (*Tinca tinca*), a dalších.

Úspěšnost reprodukce je závislé na kvalitě a kvantitě pohlavních produktů (spermií a jiker) a také na technikách s nimi spojených. Jedna z technik je kryokonzervace buněk (spermií).

Metoda, která je schopna zachovávat živé tkáně a buňky za pomoci nízkých teplot se nazývá KRYOKONZERVACE. Využívá tekutý dusík či suchý led a využívá ochranné látky – tzv. kryoprotektanty.

Metody kryokonzervace se objevuje v různých odvětvích – veterinární, humánní medicíny, ale i zootechnické praxi. Tyto metody se stále zdokonalují pro snadnější využití v praxi, konkrétně v řízené reprodukci ryb. Právě v této oblasti se metody kryokonzervace příliš nepoužívají ve srovnání s dalšími oblastmi. Využívají se jen jako doplňkový způsob uchování genofondu v ex-situ. Proto je na místě, se zaměřit na zdokonalování metod a jejich praktickou proveditelnost.

Metodou kryokonzervace jsem se zabývala v mé bakalářské práci v rámci letní rybářské školy pořádané FROV JCU. Kde jsem se zabývala jaký vliv teploty a rychlosti zmrazování a následného rozmrazování má na životnost spermií. Byla sledována motilita (pohyblivost spermií), rychlost a doba pohybu u kapra obecného (*Cyprinus carpio*) před a po

zamrazení. Byly použity kryoprotektantní media Kopeika (1986) a Kurokura (1984). Pro zmrazování spermatu byl zvolen termobox s výškami ve 3, 6 a 9 cm nad povrchem tekutého dusíku po dobu 20 minut. Během zmrazování byly měřeny průběhy teplot vně a uvnitř pejet termočlánkovým teploměrem s miniaturními sondami typu T (z mědi a konstantanu). Nejvyšších výsledků bylo naměřeno po rozmrazení ve 3 cm nad hladinou tekutého dusíku s kryoprotektantem Kopeika, kde rychlost pohybu byla $118 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ a 27 % pohyblivých spermií. S kryoprotektantem Kurokura byla naměřena rychlost pohybu $76 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ a 14 % pohyblivost spermií po rozmrazení. Čerstvé sperma mělo rychlost $136 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ a pohyblivost 88 %.

Chtěli jsme navázat na předchozí pokus, a proto naším cílem bylo porovnat různá zmrazovací media a různé zmrazovací protokoly. Dalším cílem bylo popsat změny rychlosti ochlazování v různých fázích zmrazování a jak velký vliv na zmrazování spermií kapra obecného (*Cyprinus carpio L*) má řízený seeding.

2 Teoretická část

2.1 Kapr obecný (*Cyprinus carpio*)

Významnou rybou v celosvětové akvakultuře je kapr obecný, *Cyprinus carpio* L., roční produkce přesahuje jeden milión tun (FAO, 1995). V Evropě kapr obecný patří mezi jednu z nejdůležitějších sladkovodních ryb. Z akvakulturních chovů je celková světová produkce za rok 2012 - 7,1 milionů tun (The state of World Fisheries and Aquaculture).

Na našem území se kapr chová v rybníčních odchovech na rozloze 520 km² (52.000 ha). Za rok 2010 byla celková produkce tržních ryb 20 420 tun a z toho je 17 746 tun kapr obecný (Odbor státní správy ve vodním hospodářství a správy povodí Ministerstvo zemědělství, Odbor ochrany vod Ministerstvo životního prostředí, 2010).

2.1.1 Plemena kapra obecného

Metody kryokonzervace v České republice jsou v první řadě využívány k ochraně genofondu, proto je potřeba se zmínit o variabilitě druhu kapra v širším pojetí.

Vnitrodruhová diverzita kapra je vyšší než u jiných druhů ryb uvádí Ballon (1995). Kapr byl vystaven mnoha selektivním vlivům na zvýšení své produktivity po značně dlouhou dobu. Vlastnosti, které se zlepšily, je odolnost vůči nemocem a stresu.

Znaky důležité pro hospodářské využití místních forem kaprů, byly stanoveny většinou podle podmínek země, kde byla prováděna selekce a podle požadavků místního trhu.

Ze systematického a zoogeografického hlediska rozlišuje Baruš a kol. (1995) tři poddruhy kapra: *Cyprinus Cyprinus carpio viridiviolaceus* (jihovýchodní Asie), *Cyprinus carpio carpio* (rozšíření Evropa a střední Asie), *carpio haematopterus* (východní Asie).

V oblastech výskytu v rámci jednotlivých poddruhů se formovali díky působení lokálních podmínek a činnosti člověka jejich lokální formy (plemena, linie). Kapří plemena jsou v současné době registrována v mnoha zemích východní a střední Evropy. V Rusku a v České republice se nachází katalog, kde jsou národní plemena kapra a katalog s maďarskými plemeny kaprů byl zveřejněn v dokumentech FAO (Global Programmes for Management of Genetic Resources, 2009).

Stejné schéma je i v České republice, kde z tamních populací s určitými užitkovými vlastnostmi bylo vyselektováno několik původních plemen: : např. Žďárský šupináč (Žď-Š), Žďárský lysec (Žď-L), Milevský lysec (MV), Mariánskolázeňský kapr šupinatý (ML), Jihočeský kapr šupinatý (C73), Jihočeský lysec (BV), Pohořelického lysce (PL; od roku 1998), Telčský lysec (Te), C435 a C434, Třeboňského kapra šupinatého (TŠ; od roku 2000), Pohořelického lysce (PL; od roku 1998).

Podle Pokorného a kol. (1995) byly převzaty názvy a popis plemen. Uvedená kapři plemena patří do poddruhu *Cyprinus carpio carpio*.

Amurský sazan slouží jako příklad kapra, který patří jinému poddruhu a je chován v České republice. Je představitelem poddruhu *Cyprinus carpio haematopterus*.

2.2 Spermie kapra obecného

Kapr patří mezi kostnaté ryby, tyto ryby mají jednodušší strukturu spermií. Vyznačují se tím, že nemají akrozom. Pro penetraci spermie do vajíčka slouží mikropyle (otvor ve vaječných obalech na vrcholu vajíčka). Hlavička je složena z jádra buňky, má haploidní sadu chromozomů, z chemické stránky je tvořena DNA a jadernými proteiny. Hlavička spermie má rozmanitou velikost a tvar v závislosti na druhu. Na vrcholku hlavičky spermie se u většiny živočichů nachází rozmanitě vytvarovaný membránový útvar – akrozóm, vznikající při spermiogenezi z Golgiho aparátu. Tvar připomíná zploštělý váček, který obepíná hlavičku spermie, obsahuje proteiny a enzymy, které umožňují penetraci spermie do vajíčka a podílí se na procesu oplození (Bacceti a kol., 1986). V dolní části hlavičky spermie se nachází výduť – tzv. implantační jamka. Celý povrch hlavičky spermie je chráněn cytoplazmatickou membránou, která přechází v cytoplazmatickou membránu střední části a bičíku.

Střední část spermie, nazývána krčkem, spojuje hlavičku s bičíkem spermie. Krček je pojmenován také jako centriolový oddíl. Zapadá do implantační jamky hlavičky, zahrnuje proximální a distální centrioly a rozmanitý počet mitochondrií. Hlavička spermie, střední část a bičík je chráněn cytoplazmatickou membránou.

Bičík je výkonným pohybovým aparátem. Jeho výkonná část se skládá z axonemy – mikrotubulární systém tvořen zpravidla z 9 periferních a 1 centrálního dubletu mikrotubulů, tvořeného proteinem – tubulínem (9+2). Dílčí periferní mikrotubuly jsou mezi sebou a centrálními mikrotubuly propojeny tzv. dyneinovými raménky. Celý povrch spermie je

chráněn cytoplazmatickou membránou, u některých druhů tvoří laterální výběžky – tzv. lemy.

Pohyb bičíku spermie je umožněn posouváním mikrotubulů proti sobě, kde dochází k ohybu – vlně na bičíku, která se rozšiřuje po celé délce bičíku. Vždy od hlavičky po konec bičíku. Ve struktuře axonemy se objevují molekuly enzymu ATPázy, štěpením ATP poskytuje energii pro pohyb. Délka bičíku je různá podle druhu např. u pstruha obecného (*Oncorhynchus mykiss*) 30-35 μm (Billard, 1983).

Spermie kaprovitých ryb mají hlavičku, mající okrouhlý až vejčitý tvar (Baccetti, 1984). Konkrétně kapr obecný má spermie eliptického tvaru s rozměry 2- 2.5 x 3 μm (Billard, 1986).

2.2.1 Metabolické procesy

Pro správné pochopení fungování rozmnožování ryb je důležité znát metabolické procesy. Podle různých autorů, jsou přítomny v rybích spermiích řady organických molekul, které se mohou měnit v energii a to dokazuje, že enzymatické aktivity jsou důležité pro jejich metabolismus (Turner a Korsh, 1963; Mounib a Eisan, 1968; Lahnsteiner a kol, 1993). Současně Turner a Korsh. (1963), Billard a kol. (1995) prokázali, že úloha glykolytického metabolismu je méně důležitá ve zralých spermiích. Podle Lahnsteiner a kol. (1993) a Mansour a kol. (2003), oxidační fosforylace a citrátový cyklus hraje klíčovou roli v metabolismu rybích spermií.

2.3 Kryokonzervace

Kryokonzervace (zmrazování) spermií má mnoho postupů:

- zmrazování v parách nad hladinou dusíku
- kapání do tekutého dusíku, na suchý led
- mrazení ve zmrazovacích automatech

První metoda je založena na využívání par dusíku. Sperma s kryoprotektantem je uchováno v pejetách (dutinkách) o daném objemu. Tento způsob využívali, Legendre a kol. (1980), MoczarSKI (1977), Koldras a kol. (1983).

Druhá metoda je tzv. peletizační. V zásadě to spočívá v tom, že sperma se zamrzí do pelet (kapslí) v pevném CO₂ při teplotě -79 °C (Stoss a kol., 1981a). Manipulace s peletami by měla být rychlá, aby nedocházelo k narušení struktury zmrazeného spermatu (Gamčík, 1976). Linhart a kol., 1984 zkoumal možnost zmrazení spermatu kapra obecného (*Cyprinus carpio*) na suchém ledu (CO₂). Pelety byly zmrazeny, následně rozmrazeny a ověřovala se pohyblivost spermií, byla neúspěšná, došlo k narušení hlavičky spermií.

U obou metod je kvalitní zmrazení podmíněno rychlostí zamrazení. Rychlost ovlivňuje velikost extracelulárních a intracelulárních krystalů. K dehydrataci buňky dochází při pomalém zmrazování, a tudíž vznikají velké extracelulární krystaly. Intracelulární krystaly se tvoří při rychlém zmrazování a díky tomu nedochází k dehydrataci buňky. Struktura a velikost extracelulárních a intracelulárních krystalů mohou poškodit fyziologické funkce a strukturu zmrazované buňky. K tvorbě velkých krystalů nedochází při velmi rychlém zamrazení a tudíž k narušení buňky. Při velmi rychlém zamrazení záleží na její permeabilitě a velikosti buňky (Mazur, 1980). Legendre a kol. (1980) preferují neoptimálnější rychlost zamrazení 10-40 °C za minutu nad hladinou tekutého dusíku.

2.3.1 Seeding

Seeding je metoda, která využívá kontrolované nukleace ledu. Principem je vyvolání krystalizace z extracelulárního média nad teplotu, při které se intracelulárně médium zmrazí. Následkem je, že buňka je částečně dehydratovaná a nedochází k tvorbě vnitřních krystalů ledu (Leibo, 1990). Tato metoda není příliš prozkoumána u rybích spermií, přitom by mohla

být užitečná pro rybí spermie, protože počet úspěšně zmrazených buněk by mohla zlepšit oplodnění většího počtu vajíček (během jednoho oplodnění).

2.4 Problémy při zmrazování spermií

Problémem při kryokonzervaci spermií je růst krystalů ledu. Důležité pro zabránění tvorby krystalů, je dehydratovat buňku před dosažením nižších teplot, při které dochází k ledové nukleaci. Nejčastěji se dehydratace provádí při pomalém zmrazení (<2 °C / min), protože dochází k rozšiřování intracelulární vody do hyperosmotických prostor extracelulárního media, kde se promění čistá voda v rostoucí krystaly. Avšak při pomalém ochlazování buněk může docházet k nadměrné buněčné dehydrataci, mechanickým vlivům extracelulárního ledu či jejich kombinací. Toto může vznikat při dlouhodobém vystavení vysoké koncentraci elektrolytů. Proto by měla být rychlost zamrazení dostatečně rychlá, aby se zabránilo dlouhodobé expozici buněk, ale dostatečně pomalá, aby se zabránilo vzniku intracelulárních krystalů ledu.

Nízká teplota není problémem, jestliže se dostaneme přes některé homoiotermní předsudky. Homoiotermie (živočichové se stálou tělesnou teplotou), může ohrožovat živočicha, jestliže jeho tělesná teplota klesne o několik stupňů po delší dobu. Avšak ve světě zvířat a rostlin je to velká neznámá, většina zvířat a rostlin jsou poikilotermní (ještěři, hadi) – jejich tělesná teplota se určuje podle teploty prostředí. Proto se lépe přizpůsobují okolním změnám. Některá velká zvířata (savci) mohou snížit změnu teploty pohybem, pocením a metabolismem. Rostliny mohou kontrolovat svoji teplotu mocí metabolismu a transpirace. Většina žijících druhů může přežít změny teploty v řádu desítek stupňů celsia a proto mohou přežít zmrazení. Dehydrataci v malém měřítku přežije většina druhů živočichů. Některé rostliny a nižší živočichové (semena, spóry), mohou přežít sušení na vzduchu, většina ale nepřežije (Schmidt-Nielsen, 1997).

Kryogenní teploty (v blízkosti bodu varu dusíku, -195,8 °C) nejsou nebezpečné samy o sobě. Při teplotách tekutého dusíku jsou biochemické a fyziologické pochody pomalé, kde nehrozí žádné poškození. Avšak chlazení na kryogenní teploty může zabít.

Zmrazování je však často smrtící pro buňky. Rostoucí krystaly ledu mohou způsobit mechanické poškození či narušení tkáně. Když krystaly ledu rostou uvnitř buňky, pak buňky umírají. Aby nedocházelo k poškození buněk, používají se ochranné látky (kryoprotektanty). Nejběžnější jsou methanol (MeOH), dimethylsulfoxid (DMSO), ethylen glykol (EG) a glycerol (Piironen, 1992).

Led je špatné rozpouštědlo. Tvoří se ve vodném roztoku, většina rozpuštěných látek, jsou vyloučena a zůstává koncentrovaný nemrznoucí roztok. Takže koncentrace je vysoká a může být toxická. Vysoké koncentrace solí ovlivňují elektrické či iontové interakce, včetně těch co pomáhají stabilizovat nativní stav enzymů. Častá je nezvratná denaturace a rozkládání enzymů. Led a voda spolu reagují, mají odlišné povrchy membrán a makromolekul, tato rozdílnost je důležitá pro společné interakce (pomocí povrchového napětí vody či hydrofobního efektu), podílejí se na udržení zdravého stavu uvnitř buňky či její ultrastruktury.

2.4.1 Poškození při zmrazování

Důležité je zabránit vnitrobuněčné tvorbě ledu. A to můžeme zabránit pomocí čtyř strategií: *podchlazení, bod zmrazování, dehydratace a vitrifikace*. U kryokonzervace se tyto procesy vyskytují v různé míře. Ve všech případech je rozhodující integrita buněčné cytoplazmatické membrány. Intaktní membrána je nezbytná k tomu, aby z extracelulárních krystalů ledu nevznikaly intracelulární krystaly ledu. Intaktní membrána udržuje různé kompozice intra- a extracelulárních roztoků a když dojde k protržení membrány, stanovuje se to jako buněčná smrt.

Během procesu zmrazování a osmotických změn, některé buňky prasknou. Pravděpodobně je to příčinou mechanického prasknutí, které je způsobeno postupujícími ledovými krystaly. Další příčina prasknutí může být elektrická: velké přechodné elektrické pole spojené s postupujícím ledem ve slabém roztoku elektrolytu způsobuje potenciální rozdíl buněk, a to je dostatečně velké, a tudíž dochází k prasknutí membrány (Steponkus a kol., 1985).

Zabránění tvorby intracelulárního krystalu ledu můžeme těmito postupy:

- Podchlazení

Podchlazení se týká přijetí kapaliny pod rovnovážný bod zmrazování, bez zmrazování. Výhodou je, že roztok zůstává kapalný a metabolismus se zpomalí. Nevýhoda je, že podchlazený roztok je nestabilní. Jestliže se objeví krystaly ledu, mají tendenci se zmrazit, led se formuje a vzniká koncentrovaný roztok. Ten je škodlivý při zmrazování.

Podchlazení je zásadní strategie pro některé ryby v Antarktidě, které žijí v roztoku s vyšší koncentrací a s větším zmrazovacím bodem, než jsou jejich vlastní tkáně. Jejich krev nese silný protein proti zmrznutí „antifreeze“. Tato látka, je přítomna pouze v malých molárních koncentracích, není potlačena rovnovážnou zmrazovací teplotou, ale funguje tak, že brání růstu ledových krystalů (DeVries, 1984). Dolní hranice u těchto ryb se určuje teplotou oceánu. Mírné podchlazení o pár stupňů nemá vliv na poškození, zatímco větší ochlazení může způsobit značné škody (Lutze a kol., 1998).

- Bod zmrazování

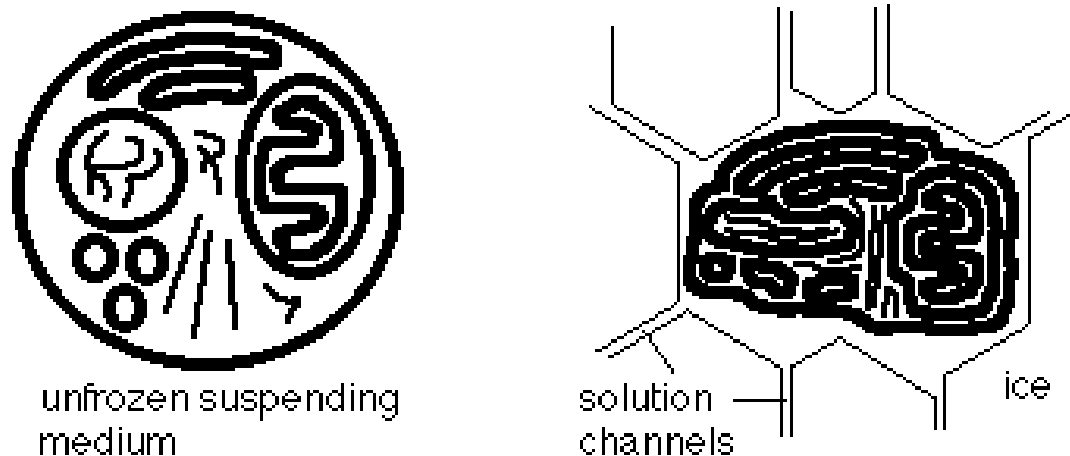
Mnoho rostlin a živočichů se nacházející v chladném prostředí, kde se hromadí rozpustné molekuly (rozpuštěných látek) v jejich intracelulárních a extracelulárních roztocích (Leopold, 1986, Lee, 1989, Koster a Lynch, 1992). Tyto rozpuštěné látky snižují rovnovážnou teplotu zmrazování. Dalším výsledkem je, že organismus je odolnější proti dehydrataci. Bod tuhnutí je více než několik stupňů celsia (°C), vyžaduje spíše vysoce koncentrované roztoky. Rozpuštěné látky, které mohou být ve vysokých koncentracích (kompatibilní) rozpuštěných látek zahrnují řadu cukrů. Vysoké koncentrace těchto molekul zvýší viskozitu, a tím sníží rozptýlení v roztocích. To zpomaluje metabolismus, výhodou je zpomalování dalších dehydratací. Hlavní význam zmrazovacího bodu v kryokonzervaci je zamezení krystalizace ve vysoké teplotě, nízkou viskozitou režimu.

- Dehydratace

Zmrazení se obvykle vyskytuje jako první vně buňky, konkrétně tam kde je jádro, a je to proto, že extracelulární roztok má větší objem než intracelulární roztok. Když se stane, že extracelulární rozpuštěné látky jsou soustředěny v malém množství nezamrzlé vody, roztok má vyšší osmotický tlak. To způsobí, že voda opustí buňku. Charakteristický čas pro vodu unikající z buněk za vyššího osmotického tlaku, se pohybuje v řádu desítek sekund (Wolfe a Bryant, 1992). Kryokonzervace obvykle využívá rychlé zmrazování. Pokud dojde k tvorbě extracelulárnímu ledu, buňky nemají čas se dehydratovat.

Mnoho druhů rostlin a živočichů, a zejména jejich semena a spory, mohou přežít buněčnou dehydrataci. Dehydratace zvyšuje osmotický tlak intracelulární roztoku (cytoplazmě), která potlačuje její teplotu zmrazování a podporuje vitifikaci. Tímto způsobem se inhibuje intracelulární tvorba ledu.

Ekvalibrace (rovnovážný stav) s ledem při teplotě asi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, nebo s atmosférou o relativní vlhkosti 80 % vyžaduje, aby složení buňky bylo asi 10 osmolal. Osmolal znamená zhruba osmoticky účinné moly, rozpuštěných látek, které jsou potřeba na kg vody. Množství dehydratace potřebné k dosažení tohoto cíle závisí na počátečním složení. Pokud by byly všechny rozpuštěné látky ideální, bude počáteční složení 1 osmolal (typická hodnota pro rostlinné buňky, a několikrát vyšší než u většiny živočišných buněk). Pak jen 10 % zůstane z původní intracelulární vody. V případě, že původní kompozice bude 2 osmolal, pak 20 % zůstane z původní intracelulární vody. V praxi jsou tyto obsahy vody podceňovány, protože osmotický tlak mnoha roztoků se zvyšuje více než s lineární koncentrací.



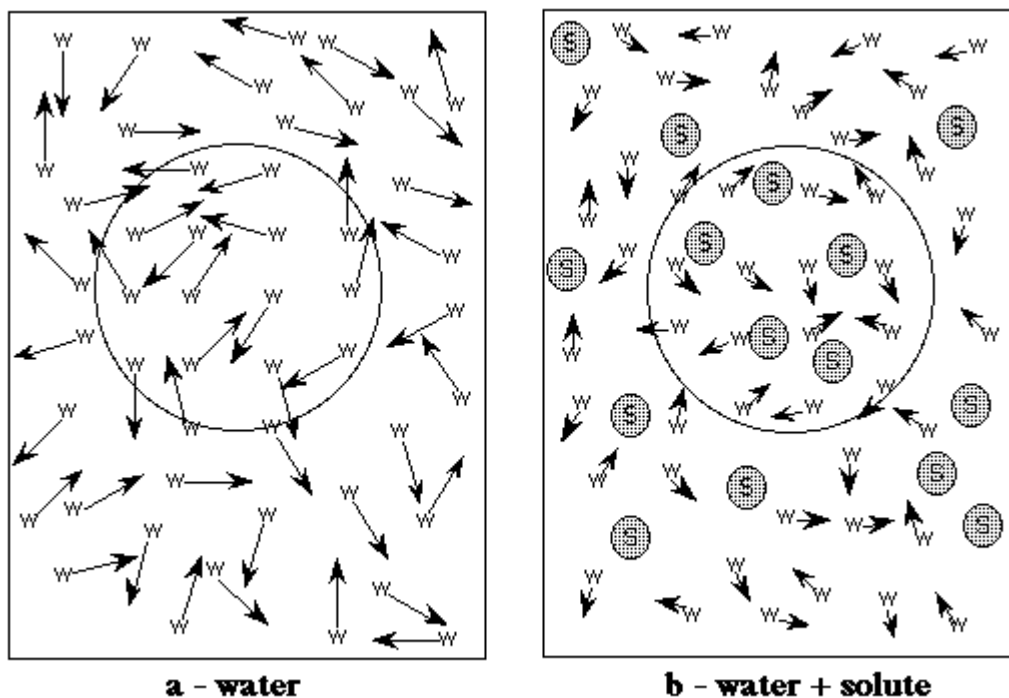
Obr. 1: Zjednodušený nákres, který znázorňuje buňku před a po zmrazení tkáně nebo podpůrného média. Zvýšený osmotický tlak způsobuje velké snížení vodné části objemu buňky. Důsledkem je, že všechny složky neobsahující vodu jsou v těsné blízkosti. Tento stav membrán se začíná podobat lamelární fázi (<http://newt.phys.unsw.edu.au/~jw/cryoblurb.html>).

- Intracelulární vitrifikace

V kryokonzervaci je cílem dosáhnout vnitrobuněčné vitrifikaci, je to rychlé zmrazení při kterém nedochází k tvorbě krystalů a poškození membrány. Jedním z rozhodujících faktorů je rychlost zmrazování. Je-li kapalina dostatečně rychle zmrazena, může se vyhnout tvorbě krystalů. Potřebné rychlosti zmrazování jsou velmi vysoké, u čistých kapalin (např. 10 miliónů stupňů za sekundu pro čistou vodu). U vodných roztoků jsou známé rychlosti ochlazování 0,1-10 °C / s (zhruba 10-1000 °C / min), tyto rychlosti jsou dostatečné pro dosažení vitrifikace.

Molekuly v kapalině náhodně procházejí Brownovým pohybem. Zmrazení může nastat v podchlazené kapalině, kde se musí rozptýlit molekuly spontánně a vytvořit malý shluk (zvané jádro nebo embryo) z molekul, které mají dočasně strukturu podobnou ledu. V podchlazené kapalině se vytvářejí shluky a rychle se rozptylují.

Pokud se však ve shluku objeví větší, nebo kritické velikosti, nastane energeticky výhodnější prostředí pro další rozptylující molekuly. Molekuly se spojí v rostoucí vzorek. Tento proces se nazývá nukleace a růst krystalů. Nukleace může být buď homogenní, nebo heterogenní, přičemž nečistoty tvoří substrát, na kterém jádra mohou růst.



Obr. 2: Zjednodušený nákres účinků rozpuštěných látek na nukleaci během zmrazení.

Molekuly vody a rozpuštěných látek jsou zastoupeny symboly W a S, resp. šipky představují difúzi, a délka šipky udává rychlost difúze. Velké kruhy představují kritický poloměr nukleace. Na obrázku (a), je zobrazena pouze voda. Kritické jádro vzniká za vzniku molekuly vody, která vypadá jako kružnice a spontánně se formuje do pravidelného krystalu. Je-li to pravidelná mřížka je to větší než kritická velikost a krystal poroste. Přítomnost rozpuštěných látek znázorňuje obrázek b (rozpuštěná látka: poměr molární vody je 1: 4). Z toho vyplývá za prvé, že rozpuštěné látky zvyšují viskozitu, takže se sníží difúze (tedy menší šipky v (b) než (a)). Za druhé, za účelem vytvoření kritického jádra, objem se rovná nebo je větší než kritický poloměr a musí být zcela bez rozpuštěných molekul. To není tento případ. Vzhledem k tomu, že koncentrace rozpuštěných látek se zvyšuje, tento efekt se stává silnější, což dále snižuje pravděpodobnost nukleace.

Pravděpodobně nukleace v podchlazené kapalině, závisí na několika faktorech:

- zvyšuje se s objemem vzorku a stupněm podchlazení,
- snižuje se zvyšující se koncentrací roztoku,
- zvyšuje přítomnost nečistot, které mohou působit na heterogenní jádra. Čistá kapalina v malém objemu bez nečistot může být podchlazená dlouhou dobu pod jeho rovnovážným bodem zmrazování. Malé objemy (mikrolitry) čisté vody, například, mohou být ochlazeny na teplotu asi $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Při velmi nízkých teplotách, viskozita roztoku stoupá prudce, a molekulární difúze se snižuje. Je-li zamrazování velmi rychlé, pak viskozita rychle stoupá a brání nukleaci. Je-li zamrazování dostatečně rychlé, viskozita může být tak velká, že molekulární difúze je účinně zastavena, a pravděpodobnost vzniku jader je zanedbatelná. Vzorek pak vypadá jako sklo nebo skelná pevná látka, a proces se nazývá vitrifikace. Sklo je amorfní (na rozdíl od krystalu, není tak velké), ale má mechanické vlastnosti pevné látky. Materiál je sklem, pokud jeho viskozita dosáhne 10^{14} Pa (Franks, 1982). Sklo má velmi dlouhou životnost (nedá se dodržet rovnováha).

2.5 Rychlé zmrazování a rozmrazování

Osmotická kontrakce (pokles osmotického tlaku) závisí na rychlosti ochlazování (Mazur, 1963), která je částečně odpovědná za optimální rychlosti zmrazování.

Při velmi pomalém zmrazování, dochází ke značné osmotické kontrakci (změně), a to může být fatální samo o sobě. Při velmi vysokých rychlostech, je málo osmotické kontrakce (změny), takže koncentrace rozpuštěných látek v cytoplasmě zůstává nízká. Tím je vitrifikace méně pravděpodobná a intracelulární zmrazení pravděpodobnější. Mírným tempem (hodnota závisí na osmotické ekvilibrační době buňky a sklonu jeho cytoplasmy do zárodku ledu), některé nefatální kontrakce (změny), mohou způsobit zvýšení koncentrace natolik, že může dojít k vitrifikaci.

Mírná osmotická kontrakce (změna) může být řízena jiným způsobem, než je rychlost ochlazování: jeden způsob, jak ochladit buňky je vysoká teplota zmrazení, umožnit jim, aby došlo k rovnovážnému stavu před rychlým chlazením. Další možností je přidat

nepronikající kryoprotektant, tj. extracelulární rozpuštěné látky, které zvyšují extracelulární osmotický tlak. Používá se hydroxyethylškrob (HES), nebo dextran. To má dva efekty: zabránění vzniku intracelulárních krystalů ledu během počátečních fází kryokonzervace a extracelulární roztok má relativně vysokou teplotu. Podrobné experimenty jsou nejasné (Bryant a kol., 1994).

Cytoplazma má vyšší koncentraci rozpuštěných látek, díky kombinaci dehydratace a přidání kryoprotektantů, mohou pronikat membránou. Toto, spolu s rychlými rychlostmi ochlazování, může společně umožnit vitrifikaci, jak je uvedeno výše. Vyšší rychlosti ochlazování umožňují nižší dávky toxických kryoprotektantů, ale rychlosti zmrazování jsou často omezeny, v praxi to znamená, že vedení tepla ochlazuje vzorky, zejména makroskopické orgány.

Jakmile bude buňka vitrifikována, je dosaženo zpomalení všech procesů metabolismu téměř na nulu. Za předpokladu, že se vzorek vyhne mechanickým otřesům, čelí další hrozbě a to je krystalizace při rozmrazení. Vitrifikační stav je nestabilní, pokud jde o led a navíc koncentrovaný roztok, zabraňuje dosažení stabilního stavu díky tomu, že má velmi vysokou viskozitou. Když teplota stoupá, klesá viskozita, molekulárního pohybu ubývá, a molekuly vody mohou difundovat a otočit se do požadované konfigurace zárodku ledu, či se přidají do stávajících jader. Pravděpodobně ledová nukleace a nebo růst závisí na době, jak dlouho je vzorek vystaven nižší viskozitě, zatímco je pod rovnovážnou teplotu zmrazování. Úspěšné zahřívání by mělo být rychlé a podobné tomuto teplotnímu rozsahu (Rall a kol., 1984). Stejně jako je tomu v případě zamrazování, rozmrazovací rychlosti jsou obvykle omezeny vedením tepla. Byl navržen mikrovlnný ohřev. Tato problematika je rozdílná, protože se rychle mění absorpční spektrum (Baudot, 1997). Je zde další problém, rychlé, ale nehomogenní rozmrazování může produkovat nebezpečné mechanické namáhání makroskopických tkání.

2.6 Pomalé zmrazování a rozmrazování

Ochlazovací a oteplovací rychlosti jsou v přírodě obvykle nízké v porovnání s charakteristickým časem na osmotický rovnovážný stav. V důsledku toho, extracelulární zmrazení často způsobuje dehydrataci blížící se hydraulické rovnováze. Výjimkou je, když nastane intracelulární vitrifikace, nedochází k další ztrátě vody.

2.7 Na kryokonzervaci (zmrazování) mohou mít vliv:

2.7.1 Vliv rozpuštěných látek (kryoprotektantů)

Přítomnost vysokých koncentrací rozpuštěných látek s nízkou molekulovou hmotností v modelových membránových systémech snižuje výskyt spojený poškozením dehydratace: snižuje se průchodnost membrány a snižuje se výskyt lamelárních fází. To může být jedním důvodů, proč se zmrazování a vysychání přizpůsobily druhy, u kterých se vyvinulo hromadění rozpuštěných látek, jako sacharóza, trehalóza nebo jiné cukry (Leopold, 1986, Crowe a kol., 1988).

2.7.2 Osmotické efekty

Při daném chemickém potenciálu vody, přítomnost více rozpuštěných látek vyžaduje přítomnost většího množství vody. Buňka, která má vyšší vnitřní koncentraci při teplotách nad bodem mrazu se uzavře, je méně v rovnováze s ledem při dané teplotě zmrazování. Dále, přidání nových rozpuštěných látek vyžaduje snížení koncentrace ostatních již přítomných. Přítomnost vysoké koncentrace cukrů snižuje koncentraci iontů, která je potřebná k danému osmotickému tlaku. Takže přítomnost cukrů snižuje nebezpečné vysoké koncentrace iontů. Rozpuštěné látky, které mohou být nahromaděné ve velkých koncentracích, aniž by měli toxické účinky, se nazývají kompatibilními rozpuštěnými látkami (Brown, 1976).

2.7.3 Snížení mechanického stresu

Za předpokladu, že se dostane roztok rozpuštěných látek do mezimembránových prostor, jejich přítomnost osmoticky přispívá ke snížení chemického potenciálu vody.

Čím delší je osmotická doba, tím menší pohlcování a tím je nižší napětí na membráně. Tento efekt může být velký (Yoon a kol., 1998; Wolfe a Bryant, 1999).

Podmínka o rozdělení je velmi důležitá: mnoho rozpuštěných látek, zejména polymerů, jsou vyloučeny z intermembránových oblastí. V důsledku toho, jejich osmotický účinek nemůže mít žádný přímý vliv na snížení povrchového napětí, a to jej může dokonce zvýšit (Koster a kol., 2000). Rozpuštěné látky, které zůstávají vně buňky, nebo ve váčcích v modelových systémech, nebudou mít žádnou přímou redukci na membránové napětí. Při teplotách nad bodem mrazu, přidání rozpuštěných látek může mít vliv na vnější roztok. Dostatečně vysoká koncentrace může dehydratovat buňku nebo váček a to může dostatečně zvýšit napětí.

Prostupující kryoprotektant (jako DMSO) se dostane snadno do rozhraní membránového prostoru. V experimentálních podmínkách není snadné vytvářet vysoké koncentrace, které by propustily rozpuštěné látky v mezi membránových prostorech. Srovnání mezi různými experimenty by mělo být pečlivé.

Yoon a kol. (1998) studoval rozpuštěné tuky ve vodném roztoku při zmrazování a použil nukleární magnetickou rezonanci, kdy signál vody magnetické rezonance stanovil rozřídění rozpuštěných látek a rozpouštědla mezi lamelárními fázemi a koncentrovaného roztoku objemovou fází v rovnováze s ledem (používali buď D_2O nebo deuterované rozpuštěné látky). U malých rozpuštěných molekul (DMSO a sorbitolu) zjistili, že fáze byly blízko. Neočekávali žádné zvláštní efekty. Zjistili, že u disacharidů, sacharózy a trehalózy (které mají přibližně dvakrát větší objem) je menší zvýšení hydratace, než by se dalo očekávat od samotných osmotických účinků. Tento účinek byl souladu s modelem, v němž tyto molekuly byly ve velmi tenké vrstvě vody, které byly nejbližší lipidům a byly vyloučeny. Yoon a kol. (1998) zjistili, že u všech studovaných rozpuštěných látek se snížilo napětí uvnitř membrány, ale že disacharidy se snížily více, než menší rozpuštěné látky. To je pouze jeden z důvodů, proč sacharóza a trehalóza může mít stejné účinky jako přírodní kryoprotektanty. Další důvody se týkají vitrifikace a krystalizace.

V zásadě, rozpuštěné látky by mohly mít v určitých ohledech vliv na povrchové napětí. V hydratační sílu se mohou modifikovat rozpuštěné látky, které jsou vázané na povrch membrány. Jedna studie zabývající se povrchovými silami nepřišla na zvláštní účinky na rozhraní membránových sil v důsledku DMSO, sorbitolu nebo trehalózy, ale tato studie byla omezena z technických důvodů na koncentraci asi 1 kmol/m^{-3} (Pincet a kol., 1994).

2.8 Rychlost a způsob rozmrazení spermatu

Rozmrazení spermatu se provádí dvěma metodami: 1. Rozmrazení bez přidání rozmrazovacího roztoku aplikovali např. Kopeika (1986) a Moczarski (1977). Kopeika preferuje rozmrazení spermatu ve vodní lázni při teplotě 40 °C po 30 s. Podstatné je dávku spermatu co nejrychleji rozmrazit (Gamčík, 1976). I při rozmrazení může docházet k tvorbě krystalů ledu (k tzv. rekrystalizaci) (Mazur, 1980), pokud je rozmrazování pomalé a také může docházet k poškození spermií. Nastává to při teplotě -85 °C (Rall a kol., 1980). Ostatní autoři uvádějí bod rekrystalizace -60 °C (Gamčík, 1976).

2. Rozmrazování s přidáním rozmrazovacího roztoku se převážně používá při zamrazení spermatu do pelet. Tento postup uvedli Legender a kol. (1980) a Stoss a kol., (1981b). Jako nejefektivnější výsledky s použitím 1% roztoku NaHCO₃ uvedli tito autoři.

2.9 Hodnocení fertility spermií a oplození jiker

Správné určení srovnatelných výsledků je vzájemný vztah mezi kvalitou jiker a kvantitou, kvalitou a počtem spermií. Dále pak mezi složením rozmrazovacího a oplozovacího roztoku. Přesná koncentrace spermií na jednu jikru se neuvádí, proto jsou výsledky pokusů velmi odlišné (Linhart, 1984 II).

3 Experimentální část

3.1 Materiály a metodika

Sperma kapra obecného (*Cyprinus carpio*) bylo odebráno od sedmi mlíčáků, (stáří 3 roky, hmotnost 1-1,5 kg). Cílem experimentu bylo otestovat různá zmrazovací média, zjistit, jaké zmrazovací protokoly jsou nejvhodnější, jaký vliv na zmrazování spermií má řízený seeding a jaké jsou rychlosti ochlazování v různých fázích zmrazování.

3.1.1 Chov ryb a odběr spermatu

Ryby byly chovány v rybníce a po výlovu byly vysazeny na líheň do nádrží o velikosti 4 m³ a o průtoku vody 0,2 l/s. Teplota vody byla 20-21 °C a nasycenost kyslíkem byla 6-7 mg/l.

Pro snazší manipulaci, ryby byly anesteziovány koupelí v roztoku fenoxxyethanolu (v poměru 1:1000). Pro vyvolání spermiace byla použita suspenze kapří hypofýzy ve fyziologickém roztoku v dávce 4 mg/kg, která byla aplikována pod prsní ploutvičku (perikardiálně) a to 24 hodin před samotným odběrem spermatu. Masáže břišní dutiny byly spermie odebrány do 10 ml plastových injekčních stříkaček. Bylo dbáno na to, aby nedošlo ke kontaminaci vodou, hlenem, močí a výkaly. Odebrané sperma bylo skladováno za aerobních podmínek při teplotě 4 °C, maximálně dvě hodiny.

3.1.2 Hodnocení pohyblivosti spermií

Jako aktivátor byla použita voda z líhně. 50 µl vody bylo napipetováno na podložní sklíčko, na špičku jehly bylo nabráno malé množství spermatu a smícháno s vodou na podložním skle, a to vše v průběhu dvou sekund a okamžitě pozorováno pod mikroskopem (Olympus BX50) v tmavém poli s použitím stroboskopické lampy o frekvenci 50 Hz. Mikroskopická obraz byl snímán videokamerou (Sony, SSCDC50AP; Sony, Tokyo,

Japonsko) a zaznamenáván na videorekordér Sony (Sony SVHS, SVO-9500 MDP, Japonsko). Tento postup byl použit i pro zmrazené a následně rozmrazené sperma.

Z videozáznamu byla v čase 10-15 sekund po aktivaci měřena rychlost spermií ($\mu\text{m/s}$) a procento pohyblivých spermií (%). Pro vyhodnocení těchto parametrů byl použit program Micro Image 4.0 (Olympus Micro-Image 4.0.1. pro Windows), který skládá pět po sobě jdoucích videosnímků do jednoho. Z každého tohoto snímku bylo vyhodnoceno 10-50 spermií. Spermie s rychlostí nižší než $10 \mu\text{m/s}$ byly považovány za nehybné tudíž za mrtvé a byly vyřazeny z další analýzy.

3.1.3 Kryokonzervace spermatu

Pro zmrazovací experimenty byly použity spermie od mlíčáků s pohyblivostí alespoň 90 %. Spermie byly ředěny v různých dávkách podle experimentálního schématu (1:1). Naředěné vzorky spermatu byly umístěny do pejet o objemu 0,5 ml (Cryovet, Francie). Naplněné pejety byly umístěny na polystyrénový rámeček (ve vodorovné poloze) a zmrazeny ve výškách 1,3,6 a 9 cm nad hladinou tekutého dusíku. V závislosti na experimentálním schématu byly poté pejety ponořeny do tekutého dusíku. Uchování v tekutém dusíku probíhalo dva dny a poté byly pejety rozmrazeny ve vodní lázni při teplotě 40°C během šesti sekund. Teplota během zmrazování (uvnitř pejety) byla zaznamenávána termočláňkovým teploměrem typu T (z mědi a konstantanu). Teploměr Data Logger (Omega, USA) byl připojen k počítači.

Každé měření bylo opakováno pět krát.

3.1.4 Statistická analýza

Ke statistickému vyhodnocování byl použit statistický program Statistica (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA), konkrétně byla zvolena analýza rozptylu ANOVA a Tukey test ($P < 0,05$).

3.2 Experimentální schéma

Cíle pokusu:

- Výběr kryoprotektantů.
- Porovnání parametrů pohyblivosti spermií kapra zmrazených při různých teplotách.
- Stanovení doby pohyblivosti a určení vhodné teploty pro zachování životaschopnosti spermií po rozmrazení.
- Účinnost metody seedingu.
- Výběr kryoprotektantů

Byly použity čtyři různé kryoprotektanty s různým složením:

1) **podle Kopeiky** (1986) (59 mM NaCl, 0,68 mM KCl, 0,68 mM CaCl₂, 2,1 mM Mg₂SO₄, 27 mM NaHCO₃, 3,4 mM sacharóza, 69 mM D-manitol, 118 mM Tris-HCl, pH 8,1, 16 % Ethylenglykol 10 % vaječného žloutku) v poměru 1:1.

2) **podle Kopeiky** (1986) **bez vaječného žloutku**

3) **podle Kurokury** (1984) 62 mM NaCl, 134 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 0,39 mM MgCl₂, 2,4 mM NaHCO₃, 16 % dimethyl-sulfoxid, v poměru 1:1.

4) **podle Horvatha** (2007) 350 mM glukóza, 30 mM Tris-HCl, pH 8,0 a 20 % methanol.

Sperma bylo odebráno od 6 různých mlíčáků. Bylo zmrazeno v pejetách o objemu 0,5 ml a umístěno ve 3 cm nad hladinou tekutého dusíku po dobu 20 minut a následně bylo ponořeno do tekutého dusíku.

Po rozmrazení byl určen procentuální podíl spermií.

- Porovnání parametrů pohyblivosti spermií kapra zmrazených při různých teplotách.

Bylo odebráno sperma od 13 mlíčáků. Zmrazování probíhalo v 1, 3, 6 a 9 cm nad hladinou tekutého dusíku s kryoprotektantem č. 1 (Kopeika 1986). Rychlost, pohyblivost a doba pohyblivosti byla měřena po rozmrazení.

Termogramy zmrazených spermií nad různými hladinami tekutého dusíku jsou uvedené na grafu č.1.

- Stanovení doby pohyblivosti a vhodné teploty pro zachování přežití spermií po rozmrazení.

Vzorky spermatu byly umístěny do pejet o objemu 0,5 ml a byly dány do 3 cm nad hladinou tekutého dusíku. Jako kontrolní čas, bylo zvoleno 20 minut jako potřebná doba pro zachování životaschopnosti spermií před ponořením do tekutého dusíku. Až po rozmrazení vzorků spermatu od 7 mlíčáků byly stanoveny parametry spermií, ve srovnání s kontrolními podmínkami (Graf č. 2).

- Účinnost metody seedingu.

Byly použity dvě různé metody seedingu k vyvolání tvorby krystalů ledu a k ochraně vzorků před přechlazením.

- a) Ponoření rámečku se vzorky do tekutého dusíku po dobu 1 sekundy
- b) Dotykem ve střední části pejety pomocí pinzety, dříve než dojde k ochlazení tekutým dusíkem.

Na grafu č. 3 jsou zobrazeny termogramy spermií během zmrazování za pomoci výše uvedených podmínek seedingu. Pohyblivost spermií byla měřena po rozmrazení spermií (od 7 mlíčáků), zmrazování probíhalo ve 3 cm nad tekutým dusíkem, v 0,5 ml pejetách s kryoprotektantem č. 1 (Kopeika 1986).

Výsledné hodnoty byly srovnávány s kontrolní skupinou, kde byl použit ten samý postup zmrazování, avšak bez použití metody seedingu.

4 Výsledky

V této studii byly použity čtyři různé kryoprotektanty. Pohyblivost spermií po rozmrazení je dána procentuálně z celkového množství spermií v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1. Pohyblivost spermií po zmrazení a rozmrazení s použitím různých kryoprotektantů je dána v procentech. Hodnoty s různými čísly, které byly označeny hvězdičkou, se výrazně lišily.
($P < 0,05$).

Kryoprotektantní médium	Pohyblivost spermií po rozmrazení (%)	Roztoky podle autorů
1	$31 \pm 8^*$	Kopeika (1986)
2	22 ± 9	Kopeika (1986) bez vaj.žloutku
3	18 ± 11	Kurokura (1984)
4	n/a	Horvath (2007)

Zmrazování s kryoprotektantem č. 1 bylo pozorováno nejvyšší procento pohyblivých spermií po rozmrazení. U kryoprotektantů č. 2 a č. 3 vykazovaly spermie po rozmrazení nižší procento pohyblivosti a významně se mezi sebou nelišily. Zmrazování s kryoprotantem č. 4 nebylo úspěšné, protože u části spermií docházelo ke shlukování. Z toho vyplývá, že nejúspěšnější kryoprotektant byl č. 1 (Kopeika, 1986). Byl zvolen pro následující pokusy.

V tabulce č. 2 jsou uvedeny hodnoty pohyblivosti spermií po zamrazování spermií (v pejetách) s kryoprotektantem č. 1, které byly umístěny nad různými hladinami nad tekutým dusíkem.

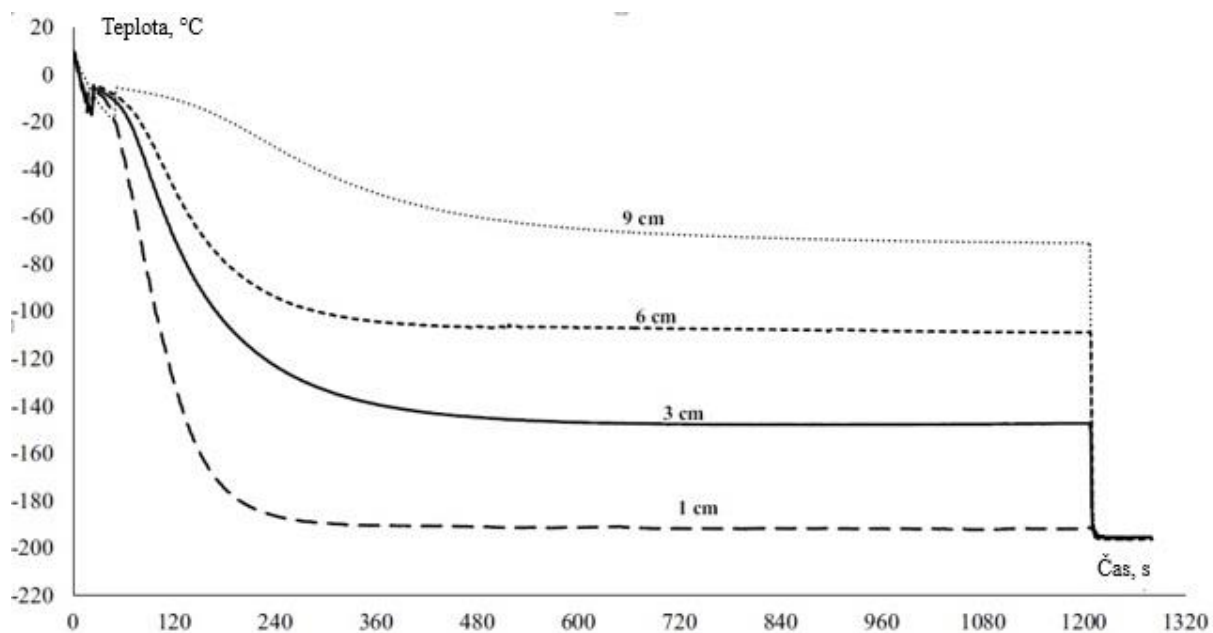
Tabulka č. 2. Rychlost, doba pohyblivosti a procento spermií ve vzorcích při zmrazování v různých hladinách nad tekutým dusíkem. Rozdílná písmena znamenají statistické rozdíly mezi skupinami.
($P < 0,05$).

Hladina nad tekutým dusíkem, (cm)	Odpovídající teplota (°C)	Rychlost ($\mu\text{m/s}$), ($\pm 0,95$ CI)	Doba pohyblivosti, (s), ($\pm 0,95$ CI)	Pohyblivost (%), ($\pm 0,95$ CI)
1	-190 °C	0 ^a	0 ^a	0 ^a
3	-150 °C	118 \pm 9 ^c	52 \pm 3 ^b	33 \pm 8 ^c
6	-110 °C	84 \pm 4 ^b	50 \pm 2 ^b	24 \pm 8 ^{bc}
9	-70 °C	84 \pm 3 ^b	49 \pm 3 ^b	12 \pm 7 ^b
Čerstvé sperma	-	137 \pm 4 ^d	65 \pm 4 ^c	95 \pm 5 ^d

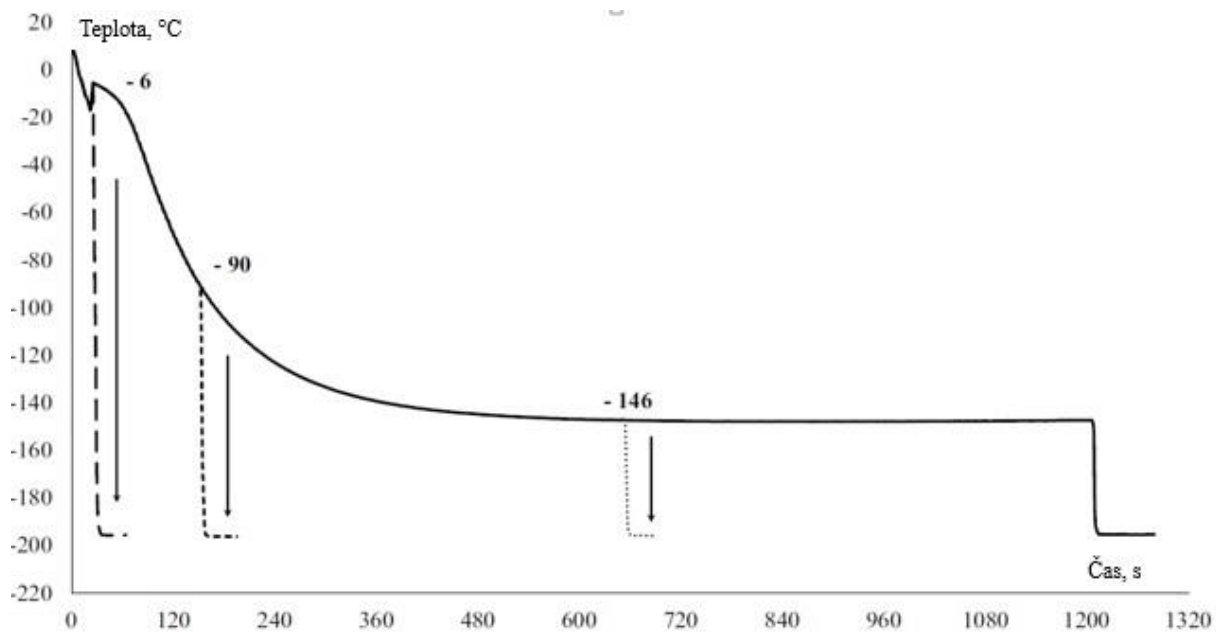
U čerstvého spermatu byly naměřeny nejvyšší parametry, konkrétně: rychlost, doba pohyblivosti a procento pohyblivosti. Nulová pohyblivost byla naměřena při zmrazování spermií, které byly umístěny v pejetách v 1 cm nad hladinou tekutého dusíku. Vyšší pohyblivost a rychlost spermií po rozmrazení, byla naměřena u zmrazovaných vzorků ve 3 cm nad hladinami tekutého dusíku. Mezi zmrazovanými vzorky ve 3, 6 a 9 cm nad hladinami tekutého dusíku nebyla významně odlišná doba pohyblivosti. (Graf č. 1) Nulová pohyblivost spermií byla u spermií, které byly ponořeny do tekutého dusíku před nebo bezprostředně po zahájení bodu krystalizace (-16 °C). Pohyblivost spermií po zmrazení a rozmrazení nebyla významně ovlivněna u vzorků, které byly ponořeny do tekutého dusíku po ochlazení (-90 °C) nebo při nižší teplotě (Graf č. 2).

Při použití metody "a" seedingu (kde pejety byly ponořeny do tekutého dusíku za 1 s) vedlo ke změně rychlosti ochlazování vzorků 52-115 °C/min, po rozmrazení byla 0 % pohyblivost. U metody "b" seedingu (ochlazování pomocí pinzety) nevedlo ke změnám rychlosti teploty (51 °C/min), s výjimkou nepřítomnosti podchlazení (Graf č. 3).

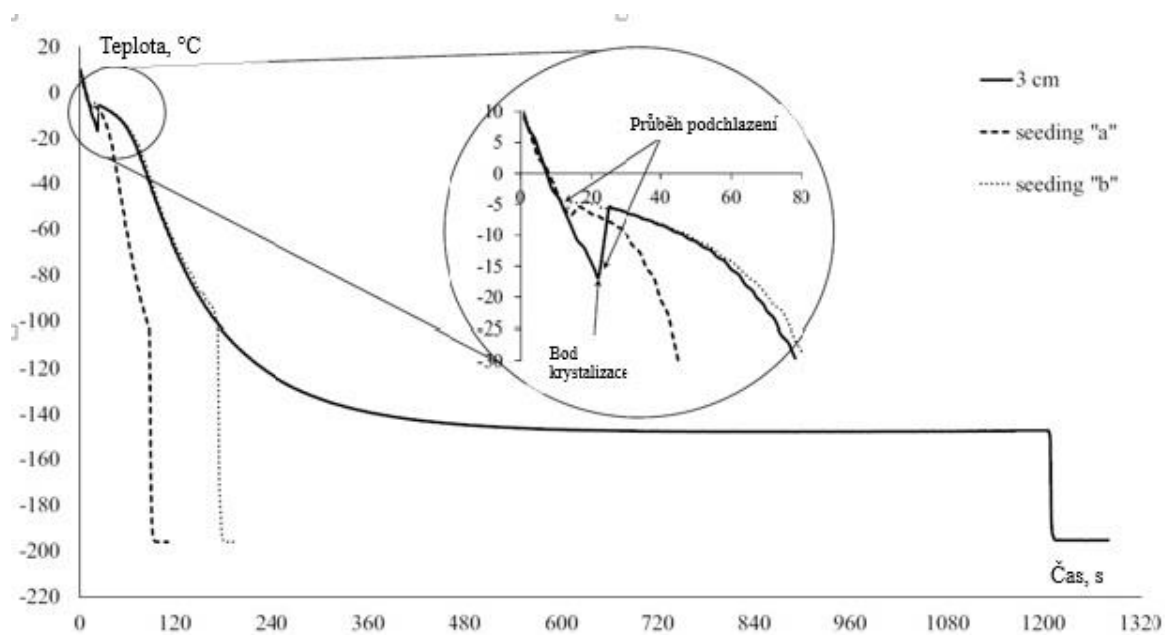
Při použití těchto podmínek, jsme nepozorovali žádné zvýšení pohyblivosti spermií po rozmrazení v porovnání s kontrolní skupinou.



Graf. č. 1: Termogramy zmrazených spermií kapra obecného nad různými hladinami tekutého dusíku (1,3,6 a 9 cm nad tekutým dusíkem).



Graf č. 2 Termogramy spermií kapra obecného inkubovaného ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku při různých časových intervalech před ponořením do tekutého dusíku (vertikální šipky).



Graf č. 3: Termogramy spermií kapra obecného během zmrazování za pomoci metod seedingu ve 3 cm nad tekutým dusíkem: metoda „a“ ponoření rámečku se vzorky do tekutého dusíku po dobu 1 sekundy. Metoda seedingu „b“ dotknutí ve střední části pejety pomocí pinzety, dříve než dojde k ochlazení tekutým dusíkem.

5 Diskuze

Zmrazování spermií ryb se liší podle druhu a podle jejich podmínek (chovných, ekologických a geografických), (Lahnsteiner, 1995). Po celém světě je mezi kapřími subpopulacemi vysoká rozmanitost. Tyto ryby mají různou rozmnožovací fyziologii (Flajšhans a kol, 2006). Tato skutečnost může mít vliv na úspěch oplození, pohyblivost spermií či odolnost při zmrazování spermií. Vlastní metody pro postup zamrazování spermií kapra uvádějí někteří autoři. V našem pokusu jsme se zabývali pouze 3 kryoprotektanty – Kopeika, Kurokura, Horvath (v jednom případě byl použit roztok Kopeika bez vaječného žloutku). Roztok podle Kopeiky (1986) měl ve výsledku nejvyšší procento pohyblivých spermií po rozmrazení a byl zachován pro následující experimenty.

Zajímavou otázkou je přítomnost cukrů v kryoprotektantech. Jednoduchý cukr na bázi kryoprotantu se setkal s malým úspěchem u kapra obecného (Babiak a kol., 1997). Fruktóza a glukóza byly publikovány jako složky některých kryoprotektantů využívaných pro zmrazování spermií jiných kaprovitých druhů (Kumar, 1988; Zhang a Liu, 1991). Většina publikací uvádí kryoprotektant podle Kurokury jako využívaný (Kurokura a kol., 1984, Lubzens a kol., 1993), její modifikace (Magyary a kol., 1996) nebo jiné iontové roztoky (Lahnsteiner a kol., 2000). Kryoprotektanty s cukry byly úspěšně použity pro kryokonzervaci spermií jiných druhů ryb, například u sumečka afrického (Steyn a Van Vuren, 1987; Urbányi a kol., 1999), u jeseterů (Tsvetkova a kol., 1996; Glogowski a kol., 2002). Kryoprotektant s cukry je úspěšný kryoprotektant a membránový stabilizátor (Maisse, 1996). Podle Horvatha a kol. (2003) došlo při použití kryoprotektantu s cukry ke shlukování spermií, avšak to nemělo vliv na oplození. Metanol byl nejúspěšnější kryoprotektant i pro jiné kaprovité druhy jako je *Danio rerio* (Harvey a kol., 1982), potom i pro lososovité druhy ryb (Lahnsteiner a kol., 1997), vlkouš (Steyn, 1993; a Van Steyn Vuren, 1987, Tiersch a kol, 1994) nebo tilapie (Harvey, 1983). Babiak a kol. (1997) dosáhl nejvyšších výsledků u kapra při používání DMA (dimethyl-acetamidu) než s kryoprotektantem DMSO. Bylo zjištěno, že methanol je netoxický při použití jako kryoprotektant, také bylo dosaženo lepších výsledků než s kryoprotektantem DMSO nebo glycerolu (Harvey a kol., 1982), včetně jeseteřích spermií (Horvath a Urbányi, 2000a). Ty jsou známé pro svou extrémní rychlost, kterou proniknou do buňky (Ashwood-Smith, 1980).

Pro snadnější pochopení pravidel zmrazování kapřích spermií, byly měněny pouze fyziologické faktory – rychlost ochlazování v průběhu pokusu, složení média zůstalo stejné. Naše dosažené výsledky pohyblivosti spermií po rozmrazení vykazují, významný rozdíl mezi vzorky zmrazené nad různými hladinami nad tekutým dusíkem. Proto optimální protokol zmrazování by mohl být stanoven pomocí rychlosti ochlazování před bodem krystalizace 82 a po 52 °C/min, podmínky které odpovídají teplotě u vzorků inkubovaných při -150 °C (3 cm nad tekutým dusíkem, graf. č. 1). Při použití této metody bylo dosaženo vyšší rychlosti a vyšší procentuální pohyblivosti spermií po rozmrazení (porovnání s ostatními režimy – 3, 6 a 9 cm nad tekutým dusíkem). Avšak hodnoty byly nižší než u čerstvého spermatu). Několik autorů uvádí, že při zmrazování spermií mohou mít vliv různé rychlosti ochlazování na rychlost tvorby krystalů ledu na jejich strukturu a to má za následek poškození spermií a snížení pohyblivosti spermií po rozmrazení (Irwan a kol., 2010; Lahnsteiner a kol., 2003; Viveiros a kol., 2001).

Tento jev může být způsoben osmotickou změnou během formování krystalu ledu, které mohou vést k letálnímu (snížení pohyblivosti spermií) nebo neletálnímu (snížení rychlosti spermií) poškození spermií během zmrazování (Boryshpolets a kol., 2009).

Podle Kopeiky (1986) a Tsai (2010) by měly být vzorky spermatu přeneseny do tekutého dusíku při -80 °C. V našem pokusu byla stanovena teplota -90 °C, při které vzorky byly stabilně zamrazeny, aby nedocházelo k tvorbě krystalů ledu. Po dosažení této teploty, mohly být vzorky přeneseny do tekutého dusíku a pohyblivost po rozmrazení nebyla ovlivněna. Vzorek by mohl být přenesen do tekutého dusíku po určité době inkubace při ještě vyšší teplotě (-40 °C), (Viveiros a kol., 2001). Naše pokusy byly prováděny při vyšších rychlostech ochlazování.

Náš výsledek je použitelný v praxi, kdy se musí zmrazit velké množství spermatu a je nutné znát nejkratší možnou dobu k zmrazení jednoho vzorku. Důležité je znát dobu, kdy je nutné vzorky přenést do tekutého dusíku (před nebo bezprostředně po bodu krystalizace). V našem případě byla výsledkem nulová pohyblivost. Pravděpodobně to bylo tím, že rychlost ochlazování byla příliš vysoká, což může mít nevratný vliv na poškození spermií během zamrazování, takže je situace obdobná jako zamrazení na 1 cm nad hladinou tekutého dusíku. Došli jsme k závěru, že rychlost ochlazování a doba tvorby krystalu ledu (po bodu krystalizace -90 °C) jsou základními prvky, které řídí úspěšnou kryokonzervaci rybích spermií.

Vybrali jsme dvě metody řízeného seedingu. Jako první byla zvolena metoda, která využívá polystyrénový rámeček, na kterém byly umístěny vzorky a po dobu 1 sekundy byly ponořeny do tekutého dusíku. Rychlost ochlazování se zvýšila. Toto zvýšené ochlazení mělo za následek zvýšení odpařování tekutého dusíku po kontaktu s rámečkem a to vedlo k obdobné situaci jako zmrazování v 1 cm nad hladinou tekutého dusíku, kde byla nulová pohyblivost spermií po rozmrazení. Jako druhá metoda byla zvolena ochlazování pinzetou. Chtěli jsme zabránit přechlazení vzorku, ale zachovat rychlost ochlazování a pohyblivost spermií po rozmrazení. Používali jsme rámeček z polystyrénu, aby byla zajištěna volná výměna tepla mezi vzorkem a okolím. Vzorek se zahřívá bezprostředně po spontánní krystalizaci a okolí se “přizpůsobuje” na teplotu vzorku. Rychlost ochlazení není důležitá. Na grafu č.3 jsme chtěli ukázat (zmrazovací křivka po seeding “b” ve 3 cm nad hladinou tekutého dusíku) překrývající se křivky. Předpokládáme, že za těchto experimentálních podmínek přechlazení vzorku během konvekčního zmrazování nezpůsobuje poškození.

Avšak v programovatelném mrazícím přístroji bez použití metody seeding se mohlo poškození objevit. V tomto případě, po přechlazení a spontánní krystalizaci se program snaží kompenzovat uvolňování tepla ze vzorku ochlazením komory. V situaci, kdy se uvolní teplo, dosáhne komora velmi nízké teploty, a to má za následek vytváření vnitřních krystalů. Důsledkem krystalizace může dojít k mnoha poškození a to díky tomu, že voda nemá čas opustit buňku (Viveiros a kol., 2001, Mazur 1984). Tento mechanismus poškození pravděpodobně vysvětluje extrémně nízkou pohyblivost v našich experimentech, při seedingu překlazením rámečku do tekutého dusíku (seeding “a”). Další možný účinek by mohl být způsoben velmi malými krystaly, které se objevují při velmi nízkých teplotách. Čím jsou krystaly menší, budou méně nebezpečné. Nicméně po rozmrazení malé krystaly tají a teplota zůstává velmi nízká. Při této teplotě voda taje, je schopna krystalizace, ale produkuje velké krystaly ledu, což vede k většímu poškození (Koshimoto a kol., 2002).

Chtěli jsme ukázat, že rychlost zamrazení po bodu krystalizace až na teplotu -90 °C, je nejdůležitějším faktorem pro úspěšnou kryokonzervaci. Tento výsledek vysvětluje, proč určení rychlosti zamrazování během tohoto období představuje zásadní krok pro sestavení zamrazovacího protokolu. V budoucích experimentech by měla být zkoumána kombinace použití programovatelných přístrojů a metod seedingu. Současná sada dat by mohla být použita pro vývoj dalších metod zamrazování spermií pro jiné druhy ryb.

6 Závěr

V našem experimentu byly porovnávány čtyři kryoprotektanty. Vybrali jsme čtyři kryoprotektanty podle Kopeiky (1986) s vaječným žloutkem a bez vaječného žloutku, Kurokura (1984) a Horvatha (2007). V našich podmínkách se jevil jako nejúspěšnější kryoprotektant dle Kopeiky (1986), obsahující vaječný žloutek.

Pro kryokonzervaci spermií je důležité vybrat správný zmrazovací protokol. Rychlost ochlazování má mít vliv na tvorbu krystalů ledu a na jejich celkovou strukturu. Následkem by mohlo být poškození životaschopnosti spermií po jejich rozmrazení. Z námi zvolených protokolů (1, 3, 6 a 9 cm nad povrchem tekutého dusíku) bylo dosaženo nejlepších výsledků ve 3 cm nad hladinou tekutého dusíku, což je nejvyšší naměřená rychlost a doba pohybu a pohyblivost spermií po rozmrazení.

Pro dosažení lepších výsledků kryokonzervace byly zvoleny dva postupy řízeného seedingu. Tím prvním bylo ponoření polystyrénového rámečku do tekutého dusíku po dobu 1 sekundy a druhým postupem bylo ochlazování pinzetou (ochlazena v tekutém dusíku). Obě zvolené metody neměly bohužel vliv na zvýšení rychlosti spermií po jejich rozmrazení.

Významným zjištěním v našem experimentu bylo, že pro úspěšnou kryokonzervaci je důležitá rychlost zamrazení po bodu krystalizace až na teplotu $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Současná sada dat by mohla být použita jako vývoj dalších metod zamrazování spermií u jeseterů a jiných druhů sladkovodních ryb.

7 Přehled použité literatury

Ashwood-Smith, M. J., 1980. Low-temperature preservation of cells, tissues and organs. In: Ashwood-Smith, M. J., Farrant, J. (Eds.), *Lowtemperature Preservation in Medicine and Biology*. Pitman Medical, Turnbridge Wells, 19–45.

Babiak, I., Glogowski, J., Brzuska, E., Szumiec, J., Adamek, J., 1997. Cryopreservation of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquac. Res.* 28, 567–571.

Baccetti, B., Burrini, A. G., Callaini, G., Gibertini, G., Mazzini, M. & Zerunian, S., 1984: Fish germinal cell. I, Comparative spermatology of seven cyprinid species, *Gamete Research* 10, 373–396.

Baccetti, B., 1986: Evolutionary trends in sperm structure. *Comp. Biochem. Phys. A* 85 (1), 29–36.

Ballon E., K., The common carp, *Cyprinus carpio* (1995): its wild origin, domestication in aquaculture, and selection as colored nishikigoi, *Guelph ichthyology reviews*, 3, 1–55.

Barus, V. & Oliva, O., 1995. *Mihulovci (Petromyzontes) a ryby (Osteichthyes)*. Academia Praha, 623.

Baudot, A., 1997, *Cryopreservation d'organes par vitrification: mesures calorimétriques et mesures diélectriques*, Doctoral thesis, Institut National Polytechnique de Grenoble, 240.

Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., Linhart, O., 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* 129, 95–112.

Billard, R., 1986. Biology of the gametes of some teleost species. *Fish Physiology and Biochemistry* 2, 115–120.

Billard, R., 1983, Ultrastructure of trout spermatozoa : changes after dilution and deep-freezing. *Cell Tissue Res.* 288: 205–218.

Boryshpolets S., Dzyuba B., Rodina M., Li P., Hulak M., Gela D., and Linhart O., 2009, Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Cryobiology* 59, 291–296.

Brown, A.D., 1976, Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.*, 803–846.

Bryant, G. Perez, E., Sputtek, A., 1994, The influence of hydroxyethyl starch on phospholipid monolayer isotherms. *Cryo-Letters*, 299–308.

Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F., Rudolph, A.S., Wistrom, C.A., Spargo, B.J., Anchordoguy, T.J., 1988, Interactions of sugars with membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, p. 367–384.

DeVries, A.L., 1984, Role of glycopeptides and peptides in inhibition of crystallization of water in polar fishes, *Trans. R. Soc. Lond*, p. 575–588.

FAO, Aquaculture Production, 1995: FAO EIFAC, Roma 80, 713.

Flajšhans M., Hulata, G, 2006, Common carp – *Cyprinus carpio*. In: “Genetic effects of domestication, culture and breeding of fish and shellfish, and their impacts on wild populations.” D. Crosetti, S. Lapègue, I. Olesen, T. Svaasand (eds). GENIMPACT project: Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations. A European

network. WP1 workshop “Genetics of domestication, breeding and enhancement of performance of fish and shellfish”, Viterbo, Italy, 12-17th June 1-7.

Franks, F., 1982, The properties of aqueous solutions at subzero temperatures, In: Franks, F., (Ed). Water: A comprehensive treatise, vol. 7, Plenum Press, N.Y, 1–81.

Gamčík, P., 1976: Umělá insminácia a andrológia hospodárskych zvierat, Príroda Bratislava, 152–211.

Glogowski, J., Kolman, R., Szczepkowski, M., Horvath, A., Urbányi, B., Sieczyn'ski, P., Rzemieniecki, A., Domagała, J., Demianowicz, W., Kowalski, R., Ciereszko, A., 2002. Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) milt cryopreserved with methanol. Aquaculture 211, 367–373.

Harvey, B., 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. Aquaculture 32, 313–320.

Harvey, B., Kelley, R.N., Ashwood-Smith, M.J., 1982. Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol. Can. J. Zool. 60, 1867–1870.

Horváth, A., Edit Miskolczi and Urbányi, B., 2003. Cryopreservation of common carp sperm. Aquatic Living Resources, 16, 457–460.

Horváth, Á., Urbányi, B., 2000a. Cryopreservation of sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm. In: Norberg, B., Kjesbu, O. S., Taranger, G.L., Andersson, E., Stefansson, S.O. (Eds.), Reproductive Physiology of Fish. University of Bergen, Bergen, Norway, 441.

Horváth, L., Urbányi, B., 2000b. Fish species bred in Hungary. In: Horváth, L. (Ed.), Fish Biology and Fish Breeding. Mezo"gazda Kiadó, Budapest, 229–343 (in Hungarian).

Irawan H., Vuthiphandchai V., and Nimrat S., 2010, The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Animal Reproduction Science* 122, 236–243.

Kopeika, E. F., 1968: Instrukcija po nizektemperatnomu konservirovaniju spermy kapra; Akademia nauk USSR; Mockva, 9.

Koldras M., Moczarski M., 1983: Properties of pike *Esox lucius L.* milt and its cryopreservation, *Polskie Archiwum Hydrobiologii* Polish Archives of Hydrobiology Polarchhydrobiol polarchhydrobiol, 30 (1), 69–78.

Koshimoto C and Mazur P., 2002, Effects of warming rate, temperature, and antifreeze proteins on the survival of mouse spermatozoa frozen at an optimal rate. *Cryobiology* 45, 49–59.

Koster, K. L., Lei, Y. P., Anderson, M., Martin, S., Bryant, G., 2000, Effects of vitrified and non-vitrified sugars on phosphatidylcholine fluid-to- gel phase transitions. *Biophysical Journal* 78, 1932–1946.

Koster, K. L., Lynch, D. V., 1992, Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of Puma rye. *Plant Physiol.*, 108–113.

Kumar, K., 1988. A comparative study of various extenders for cryopreservation of carp spermatozoa. *Ind. J. Anim. Sci.* 58, 1355–1360.

Kurokura, H., Hirano, R., Tomita, M., Iwahashi, M., 1984. Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture* 37, 267–273.

Lahnsteiner F., Berger B., and Weismann T., 2003, Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. *Theriogenology* 60, 829–841.

Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R. A., 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquac. Res.* 28, 471–479.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., Urbányi, B., Weismann, T., 2000. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology* 54, 1477–1498.

Lahnsteiner, F., Patzner, R.A., Weismann, T., 1993. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). *Reprod. Nutr. Dev.* 33, 349–360.

Legendre, M.; Billard, R., 1980: Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing, *Reproduction, Nutrition, Developpement*, 20 (6), 1859-1868.

Lee, R., 1989, Insect cold-hardiness: To freeze or not to freeze, *Bioscience*, 308–313.

Leibo, S.P. 1990. The theory and practise of seeding in embryo cryopreservation. *IETS Embryo Transfer Newsletter*. 8, 7–9.

Leopold, A.C., (Ed), 1986, *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*, Cornell Univ. Press, NY, 358-364.

Linhart, O., 1984: Dlouhodobé uchování spermatu některých druhů ryb, II Rozmrazování, *Buletin VÚRH Vodňany*, č. 3, 22–30.

Linhart, O., Pokorný, J., 1984: Hodnocení čerstvého spermatu ryb Metodika VÚRH Vodňany č. 14, 3–13.

Lubzens, E., Rothbard, S., Hadani, A., 1993. Cryopreservation and viability of spermatozoa from the ornamental Japanese carp (nishikigoi). *Bamidgeh* 45, 169–174.

Lutze, J.L., Roden, J.S., Holly, J.C.J., Wolfe, J., Egerton, J.J.G., Ball, M.C., 1998, Elevated atmospheric [CO₂] promotes frost damage in evergreen tree seedlings, *Plant, Cell and Environment*, 631–635.

Mansour, N., Lahnsteiner, F., Berger, B., 2003. Metabolism of intratesticular spermatozoa of a tropical teleost fish (*Clarias gariepinus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 135, 285–296.

Magyary, I., Urbányi, B., Horváth, L., 1996. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm II. Optimal conditions for fertilization. *J. Appl. Ichthyol.* 12, 117–119.

Maise, G., 1996. Cryopreservation of fish semen: a review. *Proceedings of the Refrigeration Science and Technology Conference, Refrigeration and Aquaculture. Institut International du Froid, Paris, France*, 443–467.

Mazur, P., 1963, Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing, *J. General Physiol.*, 347–369.

Mazur P., 1980: Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities, *Origin of life and evolution of biospheres*, 10 (2), 137–159.

Mazur P., 1984, Freezing of living cells – mechanisms and implications, *American Journal of Physiology* 247, C125–C142.

Moczarski M., 1977: Deep freezing of carp *Cyprinus carpio* L. sperm, Bull Acad Pol Sci Biol. 25 (3), 187-90.

Mounib, M. S., Eisan, J. S., 1968. Biosynthesis of lipids by salmon sperm from pyruvate, acetate and glyoxylate. Comp. Biochem. Physiol. 25, 193–200.

Pincet, F., Perez, E., Wolfe, J., 1994, Do trehalose and dimethylsulphoxide affect inter-membrane forces? Cryobiology, 531–539.

Piironen, J., 1992, Report on cryopreservation of fish eggs and sperm, Enonkoski State Aquaculture and Fisheries Research Station, 3–4.

Rall, W. F., Reid, D.S., Polge, C., 1984, Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods, Cryobiology, 106–121.

Rall, W. F., Reid, D. S., Farrant, J., 1980: Inocuous biological freezing during warming. Nature, 286, 511–514.

Schmidt-Nielsen, K., 1997, Animal physiology, Adaptation and environment, 218–220.

Steponkus, P. L., Stout, D. G., Wolfe, J. Lovelace, R. V. E., 1985, Possible role of transient electric fields in freezing-induced membrane destabilisation. J. Memb. Biol., 191–198.

Steyn, G. J., 1993. The effect of freezing rate on the survival of cryopreserved African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) spermatozoa. Cryobiology 30, 581–590.

Steyn, G. J., Van Vuren, J. H. J., 1987. The fertilizing capacity of cryopreserved sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. Aquaculture 63, 187–193.

Stoss, J., Holtz, W., 1981a: Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gaidneri*) sperm. I. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. *Aquaculture* 22 (1-2), 97–104.

Stoss, J., Holtz, W., 1981b : Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gaidneri*) sperm. II. Effect of pH and presence of a buffer in the diluent. *Aquaculture* 25 (2-3), 217–222.

Tiersch, T. R., Goudie, C.A., Carmichael, G.J., 1994. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. *Trans. Am. Fish Soc.* 123, 580–586.

Terner, C., Korsh, G., 1963. The oxidative metabolism of pyruvate, acetate and glucose in isolated fish spermatozoa. *J. Cell. Comp. Physiol.* 62, 243–249.

Tsai S., Spikings E., Hwang C.C., Lin C.S., 2010, Effects of the slow cooling during cryopreservation on the survival and morphology of Taiwan shoveljaw carp (*Varicorhinus barbatulus*) spermatozoa. *Aquatic Living Resources* 23, 119–124.

Tsvetkova, L. I., Cosson, J., Linhart, O., Billard, R., 1996. Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser baeri* and *A. ruthenus*. *J. Appl. Ichthyol.* 12, 107–112.

Urbányi, B., Horváth, Á., Varga, Z., Horváth, L., Magyary, I., Radics, F., 1999. Effect of extenders on sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquac. Res.* 30, 145–151.

Viveiros A. T. M., Lock E. J., Woelders H., Komen J., 2001, Influence of cooling rates and plunging temperatures in an interrupted slow-freezing procedure for semen of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Cryobiology* 43, 276–287.

Wolfe, J., Bryant, G., 1992, Physical principles of membrane damage due to dehydration and freezing. in *Mechanics of swelling: from clays to living cells and tissues*, T. K. Karalis (ed.), NATO ASI Series H, 205–224.

Wolfe, J. Bryant, G., 1999. Freezing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology*, 39, 103–129.

The state of World Fisheries and Aquaculture, dostupné z <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>, 15. 4. 2015.

Yoon, Y. H., Pope, J. and Wolfe, J., 1998. "The effects of solutes on the freezing properties of and hydration forces in lipid lamellar phases" *Biophys. J.*, 74, 1949–1965.

Zhang, X., Liu, Y., 1991. Study on the cryopreservation of fish spermatozoa. *Acta Sci. Nat. Univ. Norm. Hunan.* 14, 255–259 (in Chinese with English abstract).

8 Zkratky:

ATP – adenosintrifosfát

CO₂ – oxid uhličitý neboli suchý led

DMA – dimethylacetamid

DMSO – dimethylsulfoxid

D₂O – oxid deuteria

Pa – pascal, jednotka tlaku

9 Abstrakt

V této studii bylo zkoumáno několik různých zmrazovacích médií (kryoprotektantů), které již dříve byly vyzkoušeny různými autory, byly také vyzkoušeny různé zmrazovací protokoly pro zachování jednotlivých parametrů při zamrazování spermií. Byly prozkoumány účinky řízeného seedingu a změny rychlosti ochlazování v různých fázích zamrazování. Sperma bylo odebráno od 7 mlíčáků kapra obecného, které bylo zamrazeno v pejetách o objemu 0,5 ml.

V objektu zájmu bylo porovnat čtyři zmrazovací protokoly, které byly na různých hladinách nad tekutým dusíkem (1, 3, 6, 9 cm) (což odpovídá $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) po dobu 20 minut a následně byly přeneseny do tekutého dusíku. Nejvyšší přežití bylo dosaženo ve 3 cm nad hladinou tekutého dusíku (pohyblivost $33 \pm 8\%$) a rychlost pohyblivosti po rozmrazení spermií ($118 \pm 9\text{ }\mu\text{m/s}$).

Bylo zjištěno, že teplota $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ je optimální, při které je vhodné ponořit vzorky do tekutého dusíku bez negativního vlivu pohyblivosti spermií po rozmrazení. Pohyblivost spermií ponořených do tekutého dusíku před nebo bezprostředně po bodu krystalizace ($-16\text{ }^{\circ}\text{C}$) je 0 %.

Pohyblivost spermií zmrazených za pomoci metody seedingu nebo bez použití této metody se po rozmrazení významně nelišila. Přechlazování vzorku během běžného zmrazovacího postupu není hlavní příčinou poškození spermií v průběhu zmrazování.

Klíčová slova: kapr obecný, *Cyprinus carpio*, sperma, motilita, kryokonzervace, rychlost zmrazení

10 Abstract

In the present study, we examined several cryoextenders previously used by several authors and various freezing protocols to determine the relative importance of each parameter on sperm freezing. The effects of controlled seeding and changes in cooling rate at different stages of freezing were also examined. Sperm samples from seven individual carp males were frozen in 0.5 ml straws by conventional freezing. Cooling rates were determined by monitoring the sample's internal temperature. We compared four freezing protocols, which involved placing sperm samples at various levels (1, 3, 6, and 9 cm) above the liquid nitrogen (LN) surface (corresponding to -190, -150, -110, and -70 °C, respectively) for 20 min followed by transferring the samples into LN. Freezing at 3 cm above the LN surface resulted in the highest motility (33 ± 8 %) and velocity (118 ± 9 $\mu\text{m/s}$) of spermatozoa after thawing and diluting in swimming medium. We determined that -90 °C is an optimal temperature at which immersing the samples in LN does not affect sperm motility after thawing. The sperm motility of samples immersed in LN before or immediately after the crystallisation point (-16 °C) was 0 %. Motility of spermatozoa cryopreserved with or without a seeding procedure was not significantly different after thawing. Therefore, we hypothesise that supercooling the sample during the conventional freezing procedure is not the main damaging factor during carp spermatozoa cryopreservation.

Keywords: common carp, *Cyprinus carpio*, sperm, motility, cryoconservation, freezing rate