

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Vliv doby a teploty skladování na kvalitu  
kryokonzervovaných spermií *Danio rerio***

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Nikol Pavlů**

**Obor studia: Reprodukční biotechnologie**

**Vedoucí práce: Ing. Jiří Šichtař, Ph.D.**

**Konzultant: Mgr. Jana Oltová**

© 2018 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv doby a teploty skladování na kvalitu kryokonzervovaných spermií *Danio rerio*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4.2018 \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Jiřímu Šichtařovi, Ph.D. a paní Mgr. Janě Oltové za pomoc při vypracovávání diplomové práce a panu RNDr. Petrovi Bartůňkovi, CSc. za možnost vypracování pokusné části diplomové práce v jeho laboratoři.

# Vliv doby a teploty skladování na kvalitu kryokonzervovaných spermií *Danio rerio*

## Souhrn

Cílem této práce je ověření hypotézy, že délka a teplota skladování, ve které jsou umístěny kryokonzervované spermie *Danio rerio*, má vliv na úspěšnost *in vitro* fertilizace.

Spermie *Dánia pruhovaného* byly odebrány z extrahovaných varlat. Tato varlata byla po vyjmutí rozdrcena v kryokonzervačním roztoku bez kryoprotektantu, aby se uvolnily spermie. Následně byl přidán k roztoku spermií roztok s kryoprotektantem (metanol) v poměru 5  $\mu$ l roztoku se spermiemi na 15  $\mu$ l roztoku s kryoprotektantem. Kryokonzervované dávky byly skladovány v kryovialkách. Nejdříve byly tyto kryovialky umístěny na suchý led a po 20 minutách vloženy do tekutého dusíku, ve kterém jedna polovina kryovialek byla dále uchovávána a druhá přesunuta po deseti minutách do  $-80$  °C. V rámci pokusu byly testovány dvě teploty skladování ( $-196$  °C,  $-80$  °C) a tři doby skladování (1 den, 1 týden, 2 měsíce). Po uplynutí každého časového úseku bylo rozmrazeno 12 kryovialek z  $-196$  °C a 12 z  $-80$  °C ve vodní lázni o teplotě  $38$  °C. Samicám v narkóze se odebrala vajíčka pomocí masáže břicha, k vajíčkům byla přidána rozmražená dávka spermií spolu s vodou. Vajíčka byla inkubována v  $28$  °C po dobu 24 hodin. Po tomto čase bylo provedeno finální přepočítání životaschopných embryí. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí Studentova T-testu a ANOVY. Všechny testy byly hodnoceny na hladině významnosti  $p < 0,05$ .

Z kryokonzervovaných spermií skladovaných v  $-196$  °C bylo za 24 hodin vyvinuto průměrně  $12,5 \pm 2,2$  % embryí. V hluboko mrazícím boxu  $-80$  °C bylo průměrně vyvinutých embryí 24 hodin po oplození pouze  $0,1 \pm 0,1$  %. Navíc embrya se vyvíjela jen ze spermií skladovaných pouze 1 den a bylo jich minimální množství ( $0,3 \pm 0,3$  %). Z tohoto pokusu vyplývá, že spermie *Dánia pruhovaného* nelze skladovat v  $-80$  °C.

Kryokonzervované dávky, skladované jeden den, dosahovaly 24 hodin po oplození úspěšnosti  $13,4 \pm 4,7$  % životaschopných embryí, kryokonzervované dávky skladované jeden týden  $10,7 \pm 4,3$  % vyvinutých embryí a kryokonzervované dávky skladované dva měsíce  $13,4 \pm 4,3$  %. Pro kontrolu byly zaznamenány hodnoty z tření samic v laboratorních podmínkách, kdy embrya dosahovala 24 hodin po oplození přežitelnosti ve výši  $81,4 \pm 4,3$  % a po IVF čerstvým spermatem se vyvinulo  $35,0 \pm 4,5$  %. Mezi kryokonzervovanými dávkami spermií nebyl zaznamenán rozdíl v délce skladování.

**Klíčová slova:** spermie, kryokonzervace, *Danio rerio*, IVF, embryo

# Effect of storage time and temperature on the quality of cryopreserved zebrafish sperm

## Summary

The aim of this diploma thesis is verification of hypothesis, that the length and temperature of storage, in which the cryopreserved sperm are placed, have an impact on success on *in vitro* fertilization.

Zebrafish sperm were removed by testis dissection. These testes were crushed into cryopreserved liquid without cryoprotectant to release the sperms. Then, the cryoprotectant (methanol) was added to sperm liquid at a ratio of 5  $\mu$ l sperm liquid and 15  $\mu$ l cryoprotectant. The sperm solution were stored in cryovials. The cryovials were placed on dry ice for 20 minutes and then put into liquid nitrogen. The one half of cryovials were placed in the liquid nitrogen for whole time and the second half after ten minutes were transferred to -80 °C ultra-freezer. Within this experiment two temperatures of storage (-196 °C, -80 °C) and three storage periods (one day, one week and two months) were tested. After each tested period were thawed 12 cryovials from both tested temperatures (-196 °C and -80 °C) transferred in water bath to 38 °C. Anesthetized females were squeezed the eggs using abdominal massage. The post thawed sperms with water were added to the eggs. The eggs were incubated at 28 °C for 24 hours. After dedicated time, the final recalculation of viable embryos were done. The statistical evaluation was calculated using Student's T-test and ANOVA. All tests were evaluated at the significance level  $p < 0.05$ .

The stored temperature of zebrafish cryopreserved sperm is very important. In average,  $12.5 \pm 2.2\%$  embryos were evolved after 24 hours from cryopreserved sperm at the temperatures of -196 °C. In average,  $0.1 \pm 0.1\%$  embryos were evolved after 24 hours from cryopreserved sperm in the ultra-freezer at the temperatures of -80 °C. Moreover, the embryos developed only from sperms stored for one day was minimal ( $0.3 \pm 0.3\%$ ). This experiment follows that zebrafish sperms is impossible to storage at the -80 °C temperature.

The cryopreserved sperm stored for one day reached the success rate at the level of  $13.4 \pm 4.7\%$  viable embryos after 24 hours after IVF, for one week reached the success rate at the level of  $10.7 \pm 4.3\%$  viable embryos and for two months the success rate at the level of  $13.4 \pm 4.3\%$  viable embryos. The values were written down from female's friction in lab condition for checkup. The embryos reached the success rate at a level

of  $81.4 \pm 4.3\%$  after 24 hours after IVF of fresh sperm evolved  $35.0 \pm 4.5\%$  embryos. Between both types of cryopreserved sperm was not noticed any differences in the stored length.

**Keywords:** sperm, cryopreservation, zebrafish, IVF, embryo

# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>2</b>
<b>3. Literární rešerše .....</b>	<b>3</b>
<b>3.1. Obecné informace o druhu.....</b>	<b>3</b>
3.1.1. Pohlavní dospělost .....	3
3.1.2. Tření.....	3
3.1.2.1. Tření v přírodě.....	4
3.1.2.2. Chování při tření.....	4
3.1.2.3. Frekvence tření.....	4
<b>3.2. Laboratorní chov Dánia pruhoaného.....</b>	<b>4</b>
3.2.1. Roztoky využívané v laboratorních chovech.....	5
3.2.2. Tření v laboratorním prostředí .....	5
3.2.3. Linie .....	6
<b>3.3. Anatomie samčího pohlavního ústrojí .....</b>	<b>6</b>
3.3.1. Varlata.....	7
3.3.2. Vývody pohlavních žláz .....	7
3.3.3. Spermie .....	8
<b>3.4. Fyziologie samčího pohlavního ústrojí.....</b>	<b>9</b>
3.4.1. Endokrinní soustava.....	9
3.4.1.1. Hypotalamus.....	9
3.4.1.2. Hypofýza .....	10
3.4.1.3. Pohlavní žlázy .....	10
3.4.1.4. Urofýza.....	10
3.4.2. Spermatogeneze .....	10
3.4.3. Motilita spermíí.....	11
3.4.3.1. Vliv osmolality na motilitu.....	11
3.4.3.2. Vliv teploty a pH na motilitu.....	11
3.4.4. Oplození a embryogeneze.....	12
<b>3.5. Biotechnologické metody .....</b>	<b>14</b>
3.5.1. Kryokonzervace rybích spermíí.....	14
3.5.1.1. Kryobiologické vlastnosti.....	14
3.5.2. Odběr spermíí .....	15
3.5.3. Ředící roztok.....	16
3.5.4. Kryoprotektant .....	17
3.5.5. Balení vzorků .....	19
3.5.6. Teploty mrazení a rychlost ochlazování .....	19



3.5.7. Skladování vzorků a teplota skladování .....	20
3.5.8. <i>In vitro</i> fertilizace.....	21
3.5.8.1. Rozmrazování vzorků.....	21
3.5.8.2. Sběr vajíček a IVF.....	21
<b>3.6. Protokoly pro kryokonzervaci spermií a IVF Dánia pruhovaného .....</b>	<b>22</b>
3.6.1. Brain Harvey a kolektiv (1982) .....	22
3.6.2. Morris a kolektiv (2003).....	23
3.6.3. Draper a Moens (2009).....	24
3.6.4. Matthew a kolektiv (2017).....	24
<b>4. Materiál a metody .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1. Dánio pruhované.....</b>	<b>27</b>
4.1.1. Přirozený výtěr.....	27
<b>4.2. Odběr spermií a kryokonzervace .....</b>	<b>27</b>
4.2.1. Použité roztoky .....	27
4.2.1.1. Sperm Extender ~400 mmol/kg (E400) .....	28
4.2.1.2. Raffinose Freezing Medium (RMMB).....	28
4.2.1.3. Sperm Solution ~300 mmol/kg (SS300) .....	29
4.2.1.4. Tricain .....	29
4.2.1.5. Roztok 60x E3 médium.....	30
4.2.2. Odběr spermií .....	30
4.2.3. Kryokonzervace .....	31
<b>4.3. IVF.....</b>	<b>32</b>
4.3.1. Příprava na IVF.....	32
4.3.2. IVF.....	32
<b>4.4. Hodnocení úspěšnosti oplození .....</b>	<b>33</b>
<b>4.5. Statistická analýza .....</b>	<b>33</b>
<b>5. Výsledky .....</b>	<b>34</b>
5.1. Vliv teploty skladování kryokonzervovaných spermií na vývoj embryí po IVF ....	34
5.2. Vliv délky skladování spermií v tekutém dusíku na vývoj embryí po IVF .....	34
<b>6. Diskuze .....</b>	<b>36</b>
6.1. Vliv teploty skladování kryokonzervovaných spermií na vývoj embryí po IVF ....	37
6.2. Vliv délky skladování spermií v tekutém dusíku na vývoj embryí po IVF .....	38
<b>7. Závěr.....</b>	<b>42</b>
<b>8. Seznam literatury .....</b>	<b>43</b>

# 1. Úvod

Dáanio pruhované je akvarijní ryba a aktuálně je velmi oblíbený modelový organismus ve vědě pro svoji nenáročnost chovu, velké množství potomků, mimotělní oplození, rychlý vývoj a transparentnost embryí. Využívá se k výzkumu krvetvorby, nemocí a mnoha dalšího, pomocí geneticky modifikovaných linií. Aktuálně většina chovných zařízení drží ryby v akváriích a neustále o ně pečují, což je finančně, časově i personálně velmi náročné, a proto se vyvíjejí protokoly kryokonzervace spermií. U savců jsou již běžnou praxí obsáhlé kryobanky plemenů nebo genetických rezerv živočichů, a to je i cílem u laboratorních ryb.

Předpokládá se, že spermie vydrží skladované v tekutém dusíku roky, ale tuto hypotézu je nutné ověřit. Dále je Dánia pruhovaného velmi důležitá standardizace protokolu a jeho optimalizace na jednotlivé chovy. Kryokonzervace spermií je současně nejvýhodnější metoda skladování genetického materiálu a je důležité zjišťovat, co má vliv na kvalitu kryokonzervovaných dávek po zmrazení.

## **2. Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem práce je ověření hypotézy, že délka a teplota skladování, ve které jsou umístěny kryokonzervované spermie *Danio rerio*, má vliv na úspěšnost *in vitro* fertilizace.

## 3. Literární řešerše

### 3.1. Obecné informace o druhu

Dánio pruhované je sladkovodní pruhovaná ryba, patřící do čeledi kaprovití. Přesné zařazení této zkoumané ryby je popsáno níže:

- říše: Animalia – živočichové
- kmen: Chordata – strunatci
- třída: Actinopterygii – paprskoploutví
- řád: Cypriniformes – máloostní
- čeleď: Cyprinidae – kaprovití
- rod: *Danio* – dánio
- druh: *Danio rerio* – dánio pruhované (Hamilton, 1822)

*Danio rerio*, nebo-li Dánio pruhované, je mezi akvaristy velmi oblíbená ryba. Pochází z Přední Indie. Dorůstá délky až 4,5 cm. Žije v hejnech, která se zdržují ve středních a horních vrstvách vody. Dánio pruhované patří k mírumilovným a snášenlivým druhům. Samice jsou větší a zavalitější. Typickým znakem jsou dva páry vousů a nápadné modrobílé pruhování. Chov Dánia pruhovaného v akváriu není příliš náročný. Z tohoto důvodu se tyto ryby chovají i v laboratořích, zabývajících se genetickým výzkumem (Kůs, 2008).

#### 3.1.1. Pohlavní dospělost

Dánio pruhované dosahuje pohlavní dospělosti v laboratorním prostředí obvykle ve věku 3 až 6 měsíců po narození. Rozdíl v dosažení pohlavní dospělosti mezi laboratořemi je způsoben především managementem chovu, a to hlavně krmením. Pokud ryba přijímá krmivo častěji v rámci dne (až pětkrát denně) a zároveň není vystavena stresovým faktorům (např. dominantní větší sourozenec v akváriu), dosahuje pohlavní dospělosti kolem 3 měsíců. U těchto ryb můžeme rozeznat samce a samice již po druhém měsíci života (Spence et al., 2008).

#### 3.1.2. Tření

Důležitou roli v reprodukci a třecím chování mají čichové receptory. Samci uvolňují do vody steroidy, které u samic indukují ovulaci (Chen et Martinich, 1975) a produkují

feromony. Feromony ovlivňují početnost uvolněných vajíček při tření (Gerlach, 2006). Samice při ovulaci uvolňují feromony, které působí pozitivně na samčí třecí chování a vyvolávají tření (Vandenhurk et Lambert, 1983). Úspěšné tření *Dánia pruhoaného* je závislé také na fotoperiodě (Selman et al., 1993).

### **3.1.2.1. Tření v přírodě**

Samice ovulují převážně při svítání, (Selman et al., 1993) tření probíhá nejčastěji ráno (Spence et al., 2006). *Dánio* pruhoané se nejčastěji rozmnožuje v období silných dešťů, kdy dochází ke změně chemismu vody (Spence et al., 2008).

### **3.1.2.2. Chování při tření**

Samice si vybírají, s kterým samcem se budou třít (Spence et Smith, 2006). Samci mezi sebou o samici soupeří (Spence et Smith, 2005). Jedním z faktorů při výběru samce samicí je genotyp. Samice dokáže rozlišit příbuzného od nepříbuzného samce a upřednostňuje páření s nepříbuzným jedincem (Gerlach et Lysiak, 2006).

Před třením samci plavou těsně kolem samic a hlavou jí dráždí boky. Při tření samec plave paralelně se samicí, dotýká se jejich boků, tím, spouští vypuzování vajíček a zároveň uvolňuje spermie (Spence et al., 2008).

### **3.1.2.3. Frekvence tření**

Po dosažení pohlavní dospělosti se *Dánio* pruhoané rozmnožuje velmi často, pokud má dobré životní podmínky (Breder et Rosen, 1966). Samice jsou ochotné se pářit každý den (Spence et Smith, 2006), nicméně v laboratorním chovu se doporučuje pauza mezi nasazením minimálně týden (Westfield, 2007). Harper a Lawrence (2016) doporučuje maximální pauzu mezi nasazením 3 týdny. Tento údaj je však sporný, protože pokud jsou v akváriu společně samci a samice, tak se ryby mohou třít i zde. Z tohoto důvodu, pokud u určitých ryb chceme mít přesné informace o jejich reprodukční zdatnosti, musíme chovat samce a samice odděleně. Avšak tato strategie se v laboratorní praxi příliš nevyužívá (Harper et Lawrence, 2016).

## **3.2. Laboratorní chov *Dánia pruhoaného***

Management laboratorního chovu má určitá pravidla. Ryby využívané na pokusy musí být prosté nemocí a nesmí v chovu působit žádný faktor, který by mohl zkreslit výsledky

pokusů. Z toho důvodu se v chovech připravují roztoky ideální pro chov Dánia pruhovaného nebo se využívají speciální akvária, či celé recirkulační systémy. Často chovná zařízení pořizují krmivo určené pro laboratorní chov, aby zajistili tu nejlepší možnou výživu. Například Matthew a kolektiv (2007) připravuje samce na odběr spermií tak, že osm samců ve věku 4,5 měsíce separuje do 3,5 litrového akvária. Samci se začnou intenzivně krmit (2x denně suché krmivo a 1x denně artémie) po dobu 4 týdnů před kryokonzervací. Laboratorní chov je také velmi dynamický, neboť neustále se vyvíjí nové transgenní či mutagenní linie.

### 3.2.1. Roztoky využívané v laboratorních chovech

Médium využívané v chovu ryb mimo recirkulační systém (E3 médium) má specifické složení. Množství jednotlivých látek potřebné pro vytvoření 60x koncentrovaného roztoku z jednoho litru demineralizované vody je uvedeno v následující Tabulce č. 1.

*Tabulka č. 1 – Složení látek pro přípravu 1 litru roztoku 60x E3 médium*

Látka	Množství
NaCl	17,2 g
KCl	0,76 g
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2,9 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	4,9 g
1 M NaOH	50 µl

V chovu se roztok ředí demineralizovanou vodou na koncentraci 1x a využívá se při nasazování ryb, tření, uchovávání ryb mimo recyklační systém, odchov mladých ryb od 5 dnů (Westerfield, 2000).

Ryby a embrya mladší 5 dnů se drží v roztoku 1x E3 média a methylové modři v koncentraci 0,0001 % do 24 hodin po oplození a v koncentraci 0,00002 % od 24 hodin po oplození do 5 dnů po oplození (Westerfield, 2000).

### 3.2.2. Tření v laboratorním prostředí

Vzhledem k důvodům popsaným výše, se v laboratorní praxi samci a samice přesouvají do speciálních akvárií minimálně 12 hodin před pářením. V akváriu jsou ryby

ve stejném roztoku 1x E3 médiu, vidí na sebe, ale současně nemohou přijít do vzájemného kontaktu (Harper et Lawrence, 2016).

V laboratorním chovu jsou Dánia pruhovaná schopna reprodukovat po celý den, avšak největší množství spolu s nejkvalitnějšími embryi produkují ráno (Harper et Lawrence, 2016).

Dalším pozitivním faktorem pro reprodukci Dánií pruhovaných je čerstvá voda. Proto se doporučuje, přesunout ryby do čerstvého roztoku 1x E3 média v ranních hodinách během spojení samců se samicemi (Spence et al., 2008).

Pro tření je ideální nádoba s dvojitým dnem, aby mohla vajíčka propadávat do prostoru, kam se ryby nedostanou. Dno nádoby zároveň simuluje břeh.

### **3.2.3. Linie**

Během posledních desetiletí vytvořily laboratoře po celém světě tisíce mutantních, transgenních a divokých typů Dánia pruhovaného. Zachování všech živých linií je finančně náročné, neefektivní a mimo kapacitu chovných zařízení. Existuje tedy riziko, že mnohé z těchto cenných zdrojů výzkumu zaniknou a nebudou zachovány pro budoucí generace. Tempo vědy překračuje naši schopnost udržovat a uchovávat důležité genetické kmeny. Tento trend je také pozorován v dalších důležitých modelech zvířat. Jako příklad se nabízí myš, kde existuje více než 3 000 vyřazených kmenů a více než 28 000 mutantních kmenů. Udržování těchto velkých čísel je velice nákladné (Knight et Abbot, 2002). V současné době existuje přibližně 7 000 divokých, mutantních a transgenních kmenů Dánia pruhovaného, které potřebují odpovídající zachování (Hagedorn et al., 2009). Ideálním řešením pro uchování linií je kryokonzervace genetického materiálu (Hagedorn et al., 2009). Přestože kryokonzervace spermií Dánia pruhovaného je vyvíjena více než 30 let, vzniklé protokoly nemají standardizaci.

## **3.3. Anatomie samčího pohlavního ústrojí**

Pro zlepšení protokolů kryokonzervace spermií Dánia pruhovaného je nutné znát anatomii samčího pohlavního ústrojí a fyziologii spermií (Menke et al., 2011).

Pohlavní soustava samce tvoří párové gonády (varlata) a vývodné pohlavní cesty, které jsou podrobněji rozebírány v následujících subkapitolách.

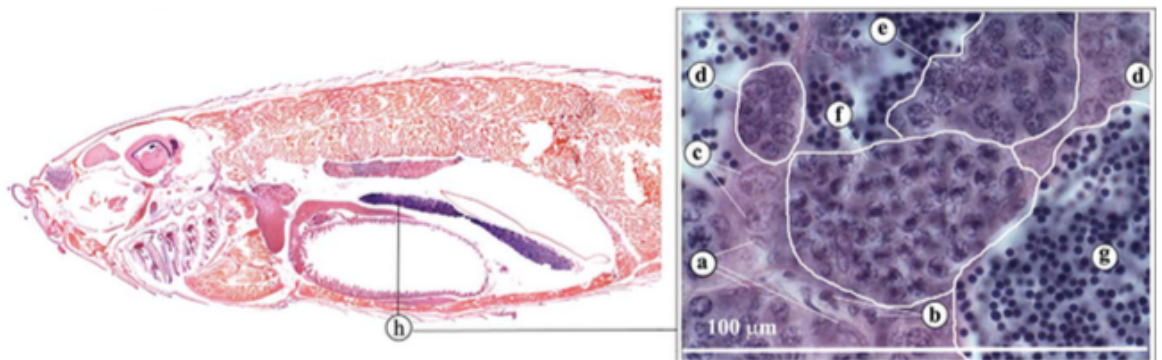
### 3.3.1. Varlata

Varlata Dánia pruhovaného jsou laterální párové orgány uložené podél plynového měchýře v břišní dutině. Obsahují parenchym a sérii tubulů a slepých váčků, které jsou lemovány spermatogenním epitelem (Roberts, 2011). Varlata jsou mléčně zbarvená, porcelánovitého vzhledu. Mají protáhlý tvar a kulovitý příčný řez (Dvořák et al., 2014).

Varle má řadu důležitých funkcí. Zejména se jedná o generativní funkci, jejímž úkolem je tvorba samčích pohlavních buněk, a endokrinní funkci, díky níž produkuje varle specifické samčí hormony (Dvořák et al., 2014). Produkci hormonů zajišťují Sertoliho a Leydigovy buňky. Sertoliho buňky zajišťují spermatogenezi a Leydigovy buňky produkují testosteron (Leal et al., 2009). Samčí reprodukční trakt a varlata znázorňují Obrázek č. 1 a Obrázek č. 2.

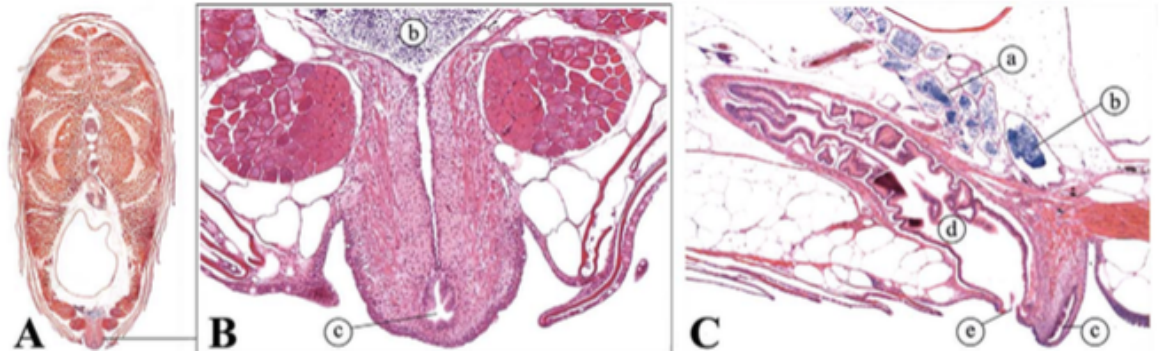
### 3.3.2. Vývody pohlavních žláz

Na varlata navazují vývody pohlavních žláz, které jsou samostatné a oddělené od močových cest. Vývody se spojují v chánovody, které ústí do urogenitální papily. Navenek ústí chánovody buď samostatně nebo spolu s močovodem (Baruš et al., 1995).



Obrázek č. 1 – Varlata. (a) Sertoliho buňky, (b) Leydigovy buňky, (c) spermatogonie A, (d) spermatogonie B, (e) spermatocyt, (f) spermatocyt a první meiotické dělení, (g) zralá spermatozoa, (h) varlata (Menke et al., 2011).

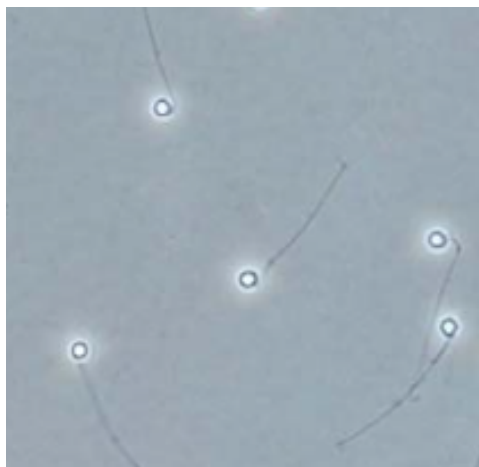




Obrázek č. 2 – Samčí reprodukční trakt. (A) příčný řez, (B) příčný řez, (C) boční pohled, (a) vývody pohlavních žláz, (b) spojení vývody pohlavních žláz, (c) genitální otvor, (d) střevo, (e) řitní otvor (Menke et al., 2011).

### 3.3.3. Spermie

Spermie Dánia pruhovaného mají malou kulatou hlavu a menší střední část, které společně tvoří protáhlou část. Na protáhlou část navazuje bičík. Průměrná velikost hlavičky spolu se střední částí je 2.2  $\mu\text{m}$ , délka bičíku činí 27.6  $\mu\text{m}$  a tloušťka bičíku je 0.4  $\mu\text{m}$  (Hagedorn et al., 2009). Obrázek č. 3 znázorňuje spermii Dánia pruhovaného.



Obrázek č. 3 – Vzhled spermie Dánia pruhovaného (Zhang et al., 2014).

Hlavička spermie Dánia pruhovaného připomíná golfový míček a nemá akrozom. Hlavičku vyplňuje převážně buněčné jádro, které obsahuje homogenní chromatin. Dále hlavičku vyplňuje pár malých vaků. Buněčné jádro má na povrchu membránu, na kterou přiléhají centrioly. Proximální centriol směřující k jádru svírá s distálním centriolem úhel 125°. Distální centriol se dotýká buněčného jádra a působí jako základní kostra (Zhang et al., 2014).

Střední část spermie Dánia pruhozaného je spojena s koncovou částí hlavičky. Cytoplazmatická membrána tvoří kanál mezi cytoplazmou a bičíkem, který je úzký, hluboký a je tvořen až do koncové části distálního centriolu. Cytoplazma kolem cytoplazmatického kanálu tvoří cytoplazmatický obal a obklopuje počáteční část bičíku. Cytoplazmatický obal je asymetrický. Na jedné straně je silnější než na druhé a obsahuje 2-6 mitochondrií, které jsou pouze na jedné straně. Membrána cytoplazmatického kanálu má dvojistou vrstvu (Zhang et al., 2014).

Bičík spermie Dánia pruhozaného je složen z axonému, což je svazek mikrotubul, uzavřený plazmatickou membránou. Obsahuje několik větších a menších transportních váčků mezi axonem a cytoplazmatickou membránou. Axonem má typickou stavbu 9 dvojitých vláken (dublety) na obvodu a dvou vláken v centru ( $2 \times 9 + 2$ ), složených z dyneinu. Nicméně v úseku mezi bičíkem a distálním centriolem chybí dvě vlákna v centru ( $2 \times 9 + 0$ ). Na konci bičíku se dublety rozptylují do samostatných mikrotubulů a snižují svůj počet na 6 vláken i méně (Zhang et al., 2014).

Spermie jsou ve varlatech a pohlavních vývodech inaktivní. Jejich aktivace je uskutečněna při kontaktu s vodou. Životaschopnost spermií je všeobecně u ryb krátká (Dvořák et al., 2014). Rybí spermie vynikají svojí rychlostí, která je mnohem vyšší než u savců.

### **3.4. Fyziologie samčího pohlavního ústrojí**

#### **3.4.1. Endokrinní soustava**

Endokrinní soustava funguje na principu hierarchie. Hlavním nadřazeným centrem je hypotalamus, který ovlivňuje množství uvolněných hormonů v hypofýze. Hypofýza ovlivňuje poté svými hormony pohlavní žlázy.

##### **3.4.1.1. Hypotalamus**

Hypotalamus je část mozku, která řídí závislé struktury. Ovlivňuje je pomocí hormonů, jimiž jsou liberiny a statiny. Liberiny stimulují aktivitu hypofýzy a statiny naopak inhibují aktivitu hypofýzy.

Hypotalamus také produkuje spouštěcí hormon gonadotropinu (GnRH – gonadotropin-releasing hormone), který ovlivňuje hypofyzární gonadotropiny (Yadav, 2008).

#### **3.4.1.2. Hypofýza**

Hypofýza je další mozkovou strukturou (Harder, 1975). Dělí se na adenohypofýzu a neurohypofýzu. Adenohypofýza produkuje dva hormony ve vztahu k reprodukci. Jedná se o folikuly stimulující hormon (FSH), který u samců vyvolává spermatogenezi, a luteinizační hormon (LH), který kontroluje činnost pohlavních žláz. FSH a LH se souhrnně nazývají gonadotropiny. U samců působí na růst intersticiální tkáně varlat a sekreci testosteronu (Yadav, 2008).

Hypofýza reaguje na zvýšení sekrece GnRH hypotalamem tím, že zvýší sekreci gonadotropinů, které stimulují vývoj gonád (Rocha et al., 2008).

#### **3.4.1.3. Pohlavní žlázy**

Pohlavní žlázy s vnitřní sekrecí produkují pohlavní buňky a hormony. Primární pohlavní hormony jsou steroidy, jejichž prekurzorem je cholesterol. Steroidní hormony se váží na intracelulární receptory a řídí genovou expresi specifických genů. Steroidní hormony vykazují negativní zpětnou vazbu na GnRH i na FSH a LH (Dvořák et al., 2014).

Samci produkují androgen zvaný testosteron z Leydigových buněk mezi kanálky varlat. Testosteron ovlivňuje u samců spermatogenezi a vývoj sekundárních pohlavních znaků.

#### **3.4.1.4. Urofýza**

Jedná se o endokrinní orgán umístěný na konci páteřní míchy v podobě hrboleku. Hrbolek je tvořen nahloučením skupiny velkých neuronů. Hrbolek je protkán množstvím cév. Svou činností se podobá hypotalamu (Saxena et Saxena, 2008). Z reprodukčního hlediska ovlivňuje urofýza kontrakce hladkých svalů urogenitálního traktu při tření ryb, jelikož uvolňuje peptidové hormony (Withers, 1992).

### **3.4.2. Spermatogeneze**

Již v raném vývoji embrya vznikají prvotní pohlavní buňky, které se u samců nazývají spermatogonie. Spermatogeneze se dělí na periodu množení, růstu a zrání.

Při periodě množení mitotickým dělením vzniknou dvě spermatogonie, které se následně opět mitoticky dělí až na čtyři spermatogonie s diploidním počtem chromozómů. Tím je ukončeno první období množení, při kterém se vytváří a formulují varlata (Baruš et al., 1995).

Perioda růstu je druhé období charakteristické tvorbou dalších spermatogonií a nástupem pohlavní dospělosti. Při jejím dosažení se spermatogonie přetvoří na pohlavní buňky – spermatocyty I. řádu.

Poslední období je perioda zrání, kdy dochází k redukčnímu dělení. Spermatocyty I. řádu se dělí na spermatocyty II. řádu, následně druhým dělením vznikají spermatidy s haploidním počtem chromozómů. Spermatidy jsou tvarem podobné buňce a následně se přetváří na dospělé spermie (Fribourgh et al., 1970).

Spermie se skladují ve varlatech, zde jsou uloženy jako neaktivní buňky. Jejich aktivace vzniká při tření a je časově krátká (Dvořák et al., 2014).

### **3.4.3. Motilita spermií**

Během přirozeného tření se spermie setká s řadou změn způsobených kontaktem s vodou (Wilson-Leedy et al., 2009).

#### **3.4.3.1. Vliv osmolality na motilitu**

Studie Wilson-Leedyho a kolektiv (2009), která analyzovala účinky osmolality média, iontů a pH na aktivaci spermií, zjistila, že při aktivaci kohoutkovou vodou byla motilita maximální za 10 s po aktivaci, kdy dosáhla úrovně 80 %. Následně klesala až na úroveň 5 % po 87 sekundách po aktivaci. Mírná osmolalita pozitivně podporuje pohyblivost spermií, zároveň zajišťuje pomalejší nástup vrcholu motility. Rychlost a motilitu dále ovlivňuje chlorid sodný a sacharóza. Motilitu lehce potlačují vápenaté kationty. Navzdory tomu, že pH a koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  nebo  $\text{K}^+$  ovariální tekutiny pravděpodobně neovlivňují motilitou spermií, může ovariální tekutina přispět ke změně osmolality roztoku. To může představovat výrazný vliv na motilitu a rychlost spermií. (Wilson-Leedy et al., 2009).

#### **3.4.3.2. Vliv teploty a pH na motilitu**

Motilita a fertilizační schopnost spermií je závislá na teplotě aktivačního média (Ginzburg, 1968) a na teplotě vody v chovných nádržích (Williot et al., 2000). S vyšší teplotou vody spermie vykazují větší aktivitu po kratší čas. Při nižší teplotě mají prodlouženou dobu pohyblivosti, ale pohybují se pomaleji (Schlenk et Kahmann, 1938).

Hodnota pH může mít přímý i nepřímý efekt. Obecně u sladkovodních ryb platí, že hodnota pH má malý vliv na aktivaci spermií (Christen et al., 1983). Nicméně pH má

nepřímý efekt na endokrinní mechanismy spojených s motilitou spermií. Gonadotropiny stimulují somatické buňky ve varlatech, které indukují produkci 17alfa-hydroxyprogesteronu. Ten se dále modifikuje, což vede k zvýšení pH v semenotvorných kanálcích varlete. Vyšší pH spouští vzrůst cAMP ve spermatu, a to má pozitivní vliv na motilitu (Yaron, 1995).

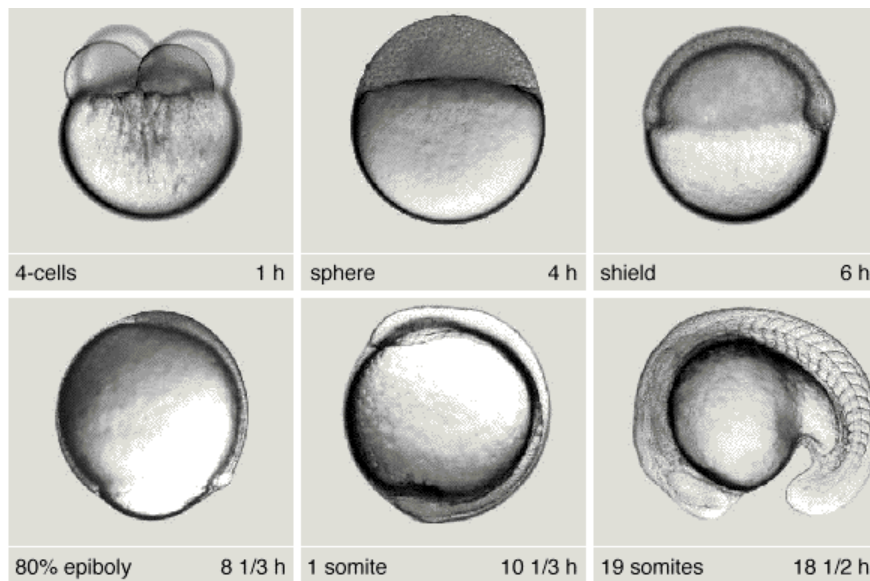
#### **3.4.4. Oplození a embryogeneze**

K oplození u Dánia pruhovaného dochází ve vnějším prostředí během výtěru bez kopulace (Dvořák et al, 2014).

Po proniknutí spermie do vajíčka vzniká zygota, přičemž stadium zygoty trvá pouhých 40 minut (Hisaoaka et Battle, 1958). Další vývojové stadium embrya se nazývá morula a je časově ohraničeno od 40 minut do 2 hodin a 45 minut po oplození. Během tohoto stádia probíhá dělení buněk v intervalu okolo 15-ti minut až do množství 128 buněk. V tomto počtu embryo přechází do stádia blastocysty (Kimmel et al., 1995).

Stádium blastocysty se vyskytuje v období od 2 hodin a 45 minut do 5 hodin a 45 minut. Buňky se dělí synchronně až do dosažení počtu 512 buněk, poté dochází k transformaci a začíná epibolie. Epibolie je první řízený pohyb buněk, kdy se v jednom směru zužují a v druhém prodlužují. V průběhu vývoje se blastocysta začíná ztenčovat a vyklenovat. Následně nastupuje stadium gastruly od 5 hodin a 45 minut do 10 hodin (Kimmel et al., 1995).

Následuje stádium segmentace, které trvá od 10 hodin do 24 hodin. Embryo se prodlužuje, vyvíjí se somity a základy jednotlivých orgánů. Buňky somitů se vyvinou v myomery a chrupavky. Dále se od základu mozku vyvíjí nervový kanál a začíná diferenciaci neuronů kolem základu mozku. Zároveň se tvoří ocasní pupen, který se postupně prodlužuje. Vyvíjí se srdce, játra a postupně se narovnává trup embrya. Taktéž dochází k tvorbě ocasního lemu. Embryo má vyvinutou chordu, somity dosahují až konce ocasu a budoucí mozek je rozdělený do 5 segmentů. Srdce, kterému se tvoří síň s komorou, začíná bít. Vzniká krevní oběh a objevují se pigmentové buňky (Kimmel et al., 1995). Obrázek č. 4 ukazuje důležitá stádia vývoje Dánia pruhovaného.



Obrázek č. 4 – Embryogeneze *Dánia pruhozaného* od oplození do 36 hodin po oplození (Haffter et al., 1996).

## **3.5. Biotechnologické metody**

### **3.5.1. Kryokonzervace rybích spermií**

Kryokonzervace je proces zmražení a uchování buněk s použitím kryoprotektiv. Problematika kryokonzervace rybích spermií se studuje u více než 200 druhů ryb a jsou vyvíjeny různé druhy protokolů (Tiersch, 2000). Využití kryokonzervace spermií Dánia pruhovaného je výhodné z několika důvodů. Za prvé vzhledem k vysokému množství veškerých transgenních a mutagenních linií je kryokonzervace spermií vhodná pro vznik kryobank linií. Další výhodou je transport a šíření nových linií mezi laboratořemi po celém světě. Neméně důležitým uplatněním je i kryosklad jednotlivých menších laboratoří. Laboratoře díky kryokonzervaci spermií nemusí držet linie ryb v akváriích a tím šetří místo i náklady.

Přeprava je také pro zvířata velmi stresující a může mít negativní vliv na jejich zdraví. Přeprava živých ryb je nákladná a s nejistým výsledkem. Důležitá je i biologická bezpečnost chovu a možná hrozba přenosu nemocí mezi laboratořemi, která při přepravě pouze mražených spermií nehrozí. Doprava kryokonzervovaných spermií je tedy dobrou alternativou pro laboratoře, které chtějí pracovat na stejných kmenech a potřebují zajistit přenos genetického materiálu (Hagedorn et al., 2009).

#### **3.5.1.1. Kryobiologické vlastnosti**

Spermie Dánia pruhovaného mají nízkou hodnotu  $V_b$  (osmoticky neaktivní část buňky) ve srovnání se spermii většiny savců (viz Tabulka č. 2). Hodnota  $V_b$  určuje, kolik obsahuje buňka osmoticky aktivní vody. Propustnost vody pro spermie Dánia pruhovaného je přibližně 30krát nižší než u savčích spermií. To může být předpoklad pro buňku, která musí fungovat v hypotonickém prostředí (např. čerstvá voda) při oplození vajíčka (Hagedorn et al., 2009).

Tabulka č. 2 – Mezdruhové porovnání vlastností ejakulátu. Tabulka porovnává objem ejakulátu a osmoticky neaktivní část buňky.

Druh	Objem ( $\mu\text{m}^3$ )	Vb	Reference
<b>Dánio pruhované</b>	12,1	0,37	Hagedorn et al., 2009
<b>Člověk</b>	25	0,50	Gilmore et al., 1995
<b>Opice</b>	28	0,51	Agca et al., 2005
<b>Myš</b>	56	0,61	Willoughby, 1996

### 3.5.2. Odběr spermií

U některých druhů se potýkáme s problémem malé tělesné velikostí a tím pádem i s velmi malým množstvím odebraných spermií. Mezi tyto druhy patří i Dánio pruhované. Tento fakt může být problémem při vývoji kryokonzervačních protokolů (Harvey et al., 1982).

Jsou známé dvě možnosti odběru spermií. První možností je odběr pomocí kapiláry (Harvey et al., 1982), druhou možností je extrakce spermií z varlat (Matthews et Carmichael, 2015).

Odběr spermií přímo pomocí kapiláry se provádí u uspaného samce masáží v blízkosti urogenitální papily většinou pod lupou. Na kapiláru se označí objem 3,3  $\mu\text{l}$ , a 20  $\mu\text{l}$ . Samec se uspí, osuší od vody (především urogenitální papila) a zafixuje do pěnové houbičky břichem nahoru. Na kapiláru se připevní trubička, která umožní nasávání obsahu do kapiláry ústy. Sběr spermií probíhá pomocí masáže břišní části těla směrem k urogenitální papile a současně nasáváním obsahu do kapiláry přiložené k papile (viz Obrázek č. 5 vlevo). Tato metoda je značně náročná kvůli malé velikosti ryb, které v dospělosti dosahují 2-4 cm. Při této velikosti má objem spermatu při správně provedeném odběru cca 1  $\mu\text{l}$ . Proto je nutná značná praxe a šikovnost při odběru. Hlavním kladem této metody je možnost opakování odběru u stejného samce. Například pokud je potřeba uchovat spermie vzácné linie ryb a současně tyto ryby využívat v jiném experimentu. Mezi negativa se řadí převážně náročnost odběru a malé množství odebraných spermií (Harvey et al., 1982).



Extrakce spermií přímo z varlat je méně náročná na provedení. Samec se uspí a usmrtí podle předpisů stanovených vyhláškou č. 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat. Následuje pitva, při níž se za hlavou na břišní straně udělá otvor pomocí nůžek. Od otvoru po obou stranách se kůže na břišní straně rozstříhne směrem k urogenitální papile. Otevře se dutina břišní. Přerušuje se spoj mezi urogenitální papilou a chámovodem a následně se pinzetou odstraní celá trávící soustava. Na dně břišní dutiny se vybaví varlata, která obklopují plynový měchýř (Matthews et Carmichael, 2015).

Varlata se vyjmou a umístí do ředícího roztoku (viz níže) v centrifugační zkumavce, který je na ledě. Jakmile jsou varlata shromážděna, opatrně se naruší tkáň uchopením do kleští a přitlačení ke stěně centrifugační zkumavky. Cílem není varlata rozdrtit, ale pouze uvolnit spermie. Roztok se nechá odstát 2 minuty, a poté se varlata vyndají (Matthew et al, 2018). V tomto čase se z varlat uvolní spermie (Yang et Tiersch, 2009). Roztok změni barvu z průhledného na mléčně bílý roztok (viz Obrázek č. 5 vpravo) (Matthew et al, 2018). Výhodou této metody je větší množství odebraných spermií a tím pádem i vyšší produkce kryokonzervovaných dávek. Nevýhodou pak nutnost usmrcení samce.



Obrázek č. 5 – Vlevo: odběr spermií u uspaného samce, Vpravo: extrakce spermií z varlat (Matthews et Carmichael, 2015).

Těmito způsoby se odebrané spermie mohou využít okamžitě k *in vitro* fertilizaci, ale mnohem častěji se mrazí a využívají na tvorbu kryobank linií (Yang et Tiersch, 2009).

### 3.5.3. Ředící roztok

Před kryokonzervací je nutné ke spermiím přidat ředidlo. To má za úkol udržet funkčnost a oplozovací schopnost spermií tím, že zajišťuje stálou hodnotu pH, osmolalitu,

koncentraci iontů a případně dodání energie. Příkladem ředícího roztoku je Hankův roztok (Hanks' balanced salt solution = HBSS). Ředící roztok se využívá ke standardizaci objemu u odběru spermií masáží břicha samce (Harvey et al., 1982) nebo jako roztok, ve kterém se uchovávají varlata (Matthew et al, 2018).

Nutností pro výrobu kvalitního ředidla je pochopení principu aktivace a motility spermií. Obvykle takový roztok obsahuje soli s určitým pH a osmolalitou, aby se zabránilo aktivaci spermií. Ředidel je několik typů (Matthew et al., 2018).

V hypotonickém prostředí je negativně ovlivněna motilita (Yang et al., 2007). Právě proto je důležité mít ředidlo izotonické k osmolalitě plazmy (cca 300 mOsmol/kg), aby byla inhibovaná aktivace (Yang et Tiersch, 2009).

#### **3.5.4. Kryoprotektant**

Kryoprotektant je látka, která ochraňuje spermie před poškozením mrazem v důsledku tvorby intracelulárních krystalů ledu a nadměrné dehydratace.

Yang a Tiersch (2009) dělí kryoprotektanty do dvou kategorií:

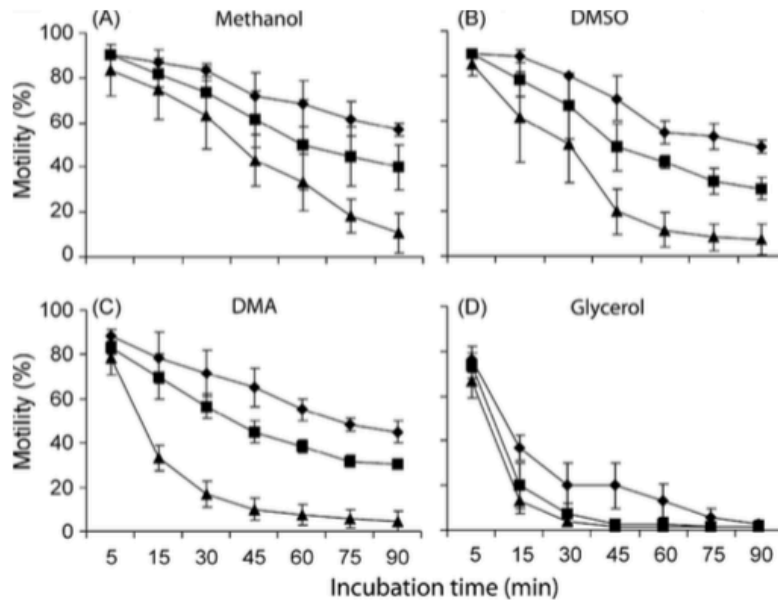
1. permeabilní: Dimethylsulfoxid (DMSO), metanol, glycerol, N,N-dimethylacetamid (DMA)
2. nepermeabilní: vaječný žloutek, mléko, proteiny

Obecně platí, že čím vyšší je koncentrace kryoprotektantu, tím lepší je ochrana buněk před mrazem. Vysoká koncentrace kryoprotektantu však může být pro spermie toxická až smrtelná. Optimální koncentrace kryoprotektantu by měla mít hodnotu, která vyvažuje oba výše uvedené účinky. Obvyklá koncentrace při kryokonzervaci spermií akvarijských ryb se pohybuje v rozmezí 5 % – 20 % (Yang et Tiersch, 2009).

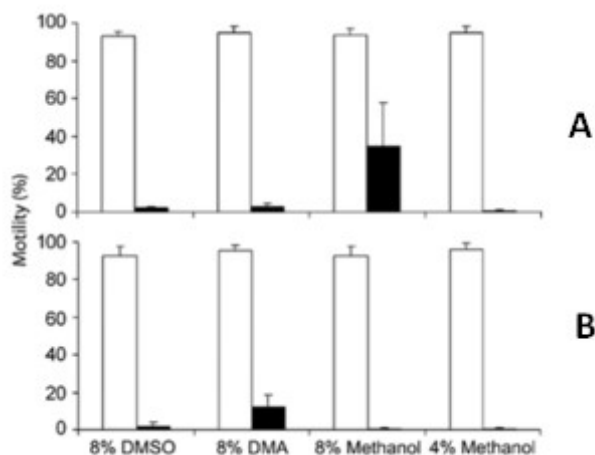
Nejvíce využívaným kryoprotektantem je metanol. Při použití metanolu je motilita a oplozovací schopnost vyšší než při použití DMSO, DMA a Glycerolu. Glycerol je pro spermie Dánia pruhovaného nejvíce toxický, a proto se nevyužívá (viz Obrázek č. 6 (Yang et al., 2007)).

Metanol, DMSO a DMA byly testovány a následně po jejich použití byla hodnocena motilita spermií. Nejlepšího výsledku dosáhl metanol o koncentraci 8 % (Yang et al., 2007). Tuto skutečnost potvrzuje i porovnání motility spermií před a po zmrazení s jednotlivými kryoprotektanty viz Obrázek č. 7. Ve studii, u níž byl použit jako kryoprotektant DMA

(10% roztok) (Morris et al., 2003), byla oplozovací schopnost spermií při IVF úspěšná v 9 – 14 případech. Oplozovací schopnost byla tedy nižší než při použití metanolu, kde úspěšnost byla v rozmezí 28 % – 51 % (Harvey et al., 1982).



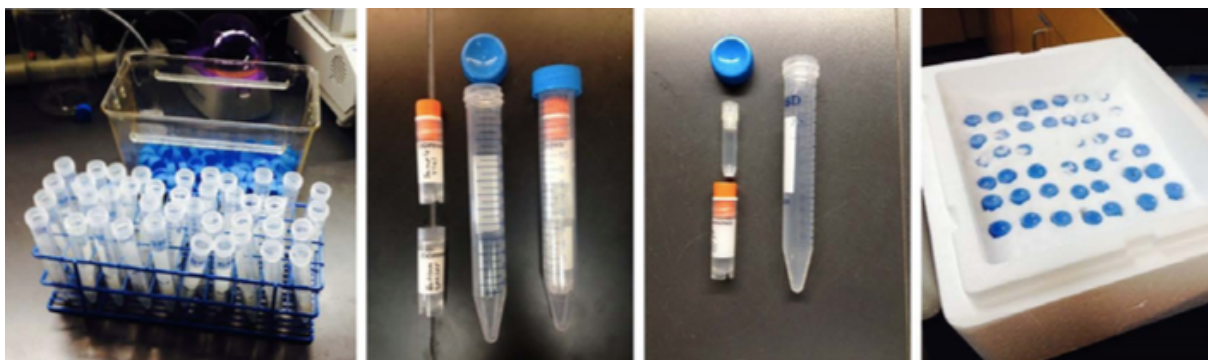
Obrázek č. 6 – Měření toxicity čtyř odlišných kryoprotektantů metanolu (A), DMSO (B), DMA (C) a glycerolu (D) o různých koncentracích. Koncentrace 5 % je znázorněna kosočtvercem, 10 % čtvercem a 15 % trojúhelníkem. Spermie jsou inkubovány v Hankově roztoku (HBSS) o osmolalitě 300 mOsmol/kg. (Yang et al, 2007).



Obrázek č. 7 – Sloupcové grafy porovnávají motilitu před zamražením (bílý sloupec) a po zamražení a rozmražení (černý sloupec). Část A byla mražena rychlostí 10 stupňů za minutu a část B rychlostí 20 stupňů za minutu mezi -5 - -80 stupni (Yang et al, 2007).

### 3.5.5. Balení vzorků

Při balení je důležitá standardizovaná rychlost ochlazování vzorku, proto je pro kryokonzervaci důležitý typ použitých nádob. U akvarijních ryb se používají plastové kryovialky, skleněné kapiláry nebo ampule (viz Obrázek č. 8). Různé tvary a materiály nádob vedou k odlišným vlastnostem prostupu chladu při zamrazování a rozmrazování. Dokonce i pro stejný typ nádoby kolísají vlastnosti u různých výrobců. Z tohoto důvodu je nutné v protokolech vždy standardizovat metody balení, aby pokus byl opakovatelný i v jiných laboratořích (Yang et Tiersch, 2009).



Obrázek č. 8 – Plastové kryovialky a způsob jejich použití (Matthews et Carmichael, 2015).

### 3.5.6. Teploty mrazení a rychlost ochlazování

Rychlost ochlazování je rozhodujícím faktorem při kryokonzervaci spermií, protože ovlivňuje osmotickou rovnováhu a pH intracelulárních a extracelulárních roztoků během mrazení. Při příliš pomalém mrazení opouští voda buňku a dochází k dehydrataci. Naopak pokud je rychlost mrazení příliš vysoká, neopouští buňku žádné nebo malé množství vody a uvnitř buňky se mohou tvořit krystaly, které buňku poškodí. Ideálním případem je vyvážená situace, kdy rychlost mrazení umožňuje přežití buňky a nevytvoření krystalů ledu uvnitř buňky. Zároveň je mrazení dostatečně rychlé, aby minimalizovalo dobu expozice působení toxických látek na buňku.

Optimální rychlost ochlazování ovlivňuje typ kryoprotektantu a živočišný druh. Experimentálně může být rychlost zamrazování předem vypočtena s využitím diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). Tato metoda odhaduje propustnost vody při nižších teplotách, to pomáhá výpočtu množství ztrát vody v buňkách při určité rychlosti ochlazování. Výstupem jsou grafy optimální rychlosti ochlazování (Devireddy et al., 1998). Skutečný způsob postupného ochlazování spermií akvarijních ryb je prováděn pomocí suchého ledu

(Harvey et al., 1982, Morris et al., 2003, Draper et al., 2004), párami tekutého dusíku nebo programovatelnými mrazáky (Yang et al., 2007).

Suchý led a pára tekutého dusíku jsou levnou variantou zmrazování spermií, kterou lze použít i v terénu. Nevýhodou je, že při jejich použití nelze proces ochlazování kvantifikovat a kontrolovat. Naproti tomu programovatelné mrazáky nabízejí spolehlivou možnost kontroly a opakovatelnost postupu, bohužel jejich pořízení je finančně náročné a nelze je využít v terénu.

S kryoprotektantem, který je složen z osmiprocentního metanolu a ředícího roztoku, byla optimální rychlost mrazení stanovena na 10 °C za minutu (Yang et al., 2007). Ginsburgův kryoprotektant (také na bázi metanolu) s obsahem mléka nejlépe funguje při ochlazování 16 °C za minutu (Harvey et al., 1982). Při použití kryovialek o objemu 2 ml a tub o objemu 15 ml ochlazovaných v suchém ledu je rychlost ochlazování kryokonzervační dávky 16,1 °C za minutu. Pokud se použijí kryovialky o objemu 0,5 ml ve stejném systému, je rychlost ochlazování 14,1 °C za minutu (Matthews et al., 2018). Nejčastěji protokoly využívají ochlazování kryokonzervačních dávek ve flakonkách v suchém ledu.

### **3.5.7. Skladování vzorků a teplota skladování**

Standardní metodou skladování kryokonzervovaných spermií akvariálních ryb je uchování v zásobníku s tekutým dusíkem (-196 °C). Při skladování jsou zásadními faktory identifikace, potencionální kontaminace a inventář mražených vzorků. Využití kryovialek umožňuje jak trvalé označení pomocí tiskárny nebo lihového fixu, tak úplné utěsnění, které minimalizuje kontaminaci nebo přenos materiálů mezi vzorky umístěnými ve stejném zásobníku (Morris et al., 2003).

Obvykle se kryovialky s roztokem spermií a kryoprotektantu skladují v tekuté fázi dusíku (Harvey et al., 1982). Spermie Dánia pruhovaného mohou být po dobu do 24 hodin po odběru skladovány při teplotě 0 °C v ledu, což umožňuje zaslání spermií poštou (Hagedorn et al., 2009).

Délka skladování kryokonzervovaných dávek není zatím přesně určena. Obecně se předpokládá, že dávky v tekutém dusíku vydrží roky (Harvey et al., 1982).

### **3.5.8. *In vitro* fertilizace**

*In vitro* fertilizace (IVF) je proces oplození vajíček odebranými spermii na Petriho misce bez projevení přirozených pářících rituálů druhu (Chang, 2013).

K IVF je nutné připravit několik roztoků a pomůcek, a sice roztok na uspání samice, papírové ubrousky, Petriho misky, štěteček, vodní lázeň, kryokonzervovanou dávku spermií, roztok na ředění a aktivaci spermií, roztok 1x E3 a methylenové modři, časovač (Harvey et al., 1982).

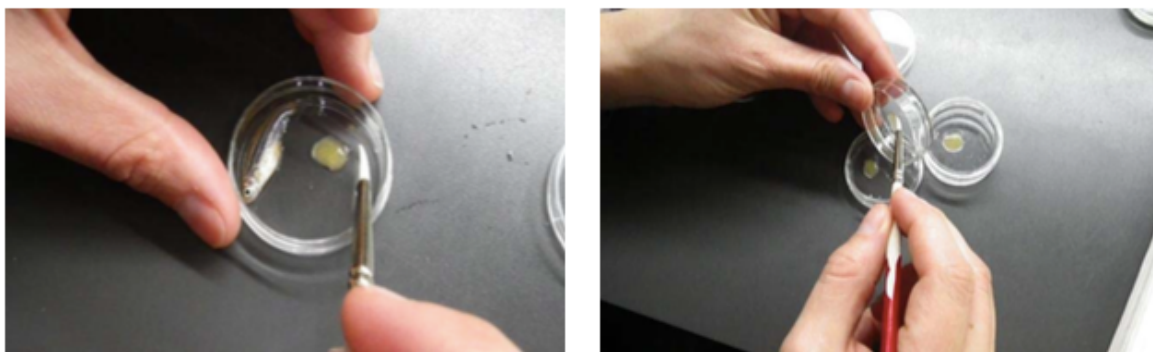
#### **3.5.8.1. Rozmrazování vzorků**

Vodní lázeň se předehřeje na 38 °C. Kryovialky se vyndají z tekutého dusíku, odšroubuje se víčko a spodní část s roztokem se ponoří do vodní lázně na 10-15 sekund. Jakmile roztok rozmrzne, přidají se roztoky pro aktivaci spermií (Matthews et Carmichael, 2015).

#### **3.5.8.2. Sběr vajíček a IVF**

Samice se večer před IVF musí oddělit od samců do speciálních nádob, aby nebyla v přímém kontaktu se samcem, ale viděla ho. Se sběrem vajíček a IVF je nejlepší začít druhý den časně z rána, protože nejvyšší kvalita vajíček je pár hodin po rozednění. Velmi důležitým krokem je také pečlivé vysušení samice, protože voda aktivuje vajíčka (Matthews et Carmichael, 2015).

Samice se uspí, vyjme na papírový ubrousek a důkladně osuší. Poté se samice přesune na plastovou Petriho misku a prstem se jí masíruje břišní krajina od kranální strany směrem k dorsální. Samice začne vylučovat z urogenitální papily vajíčka, která se přesunou na čistou Petriho misku pomocí štětečku (viz Obrázek č. 9). Každá samice může mít 100 až 400 vajíček (Harvey et al., 1982) Masáží břišní krajiny uvolní vajíčka na misku v počtu 50-150 vajíček (Draper et Moens., 2009). Ideální počet vajíček pro IVF je 50 kusů. Vajíčka s dobrou fertilitní schopností mají průhledně žlutou barvu. Špatná vajíčka jsou více vodnatá, méně konzistentní a zakalená. Samice se rychle vrátí do čisté vody, aby se probírala z anestézie. K vajíčkům se přidá připravený rozmražený roztok spermií a nechá se 2 minuty inkubovat. Později se do misky doplní voda, případně roztok vody s dezinfekčním přípravkem (např. roztok methylenové modři). Po dvou hodinách v inkubátoru o teplotě 28 °C se doporučuje oplozená vajíčka protřídít a oddělit neoplozená vajíčka od oplozených. Protřídění se vykonává v pokojové teplotě pod binokulárním mikroskopem (Matthews et Carmichael, 2015).



Obrázek č. 9 – Sběr vajíček (Matthews et Carmichael, 2015).

### 3.6. Protokoly pro kryokonzervaci spermií a IVF Dánia pruhovaného

Většina protokolů kryokonzervace, které se v současné době v laboratořích používají, je starší 25 let. Protokoly mají empirický charakter a poměrně obtížně se učí. Míra úspěchu zamrazení a oplození se v laboratořích značně liší. Většina protokolů je modifikacemi jediného postupu kryokonzervace spermií (Harvey et al., 1982), který si různými způsoby upravily jednotlivé laboratoře.

#### 3.6.1. Brain Harvey a kolektiv (1982)

##### Kryokonzervace

První protokol byl publikován před více než třiceti lety (Harvey et al., 1982). Jako kryoprotektant využívá 10% metanol. Tento protokol se začal používat nejprve v genetických laboratořích pro zachování specifických linií ryb (Draper, 2004).

Samci jsou odebráni z akvárií 15 minut po začátku jejich světelného režimu, jsou uspáni a pečlivě osušeni papírovým kapesníkem. Odběr se provádí do 10  $\mu$ l skleněné kapiláry jemnou masáží pomocí prstů. Optimální objem odebraných spermií je 0,8  $\mu$ l. Spermie se naředí ředidlem Fish ringer v poměru 1:5 (Ginsburg, 1963), následně se přidá metanol a odtučněné mléko.

Mrazení probíhá postupným ochlazováním dávek spermií 16 °C za minutu. Po dvaceti minutách se teplota pohybuje kolem -79 °C. Při této teplotě se dávky přemísťují do tekutého dusíku.

## **IVF**

Samice se nejprve uspí a následnou masáží se uvolní vajíčka na Petriho misku. Rozmrazení dávky se provádí na vzduchu. Do rozmrazené dávky se přidá 40% roztok Fish ringer v destilované vodě a roztoky se vzájemně promíchají. Následně se aktivované spermie přidají k vajíčkům pomocí 50  $\mu$ l pipety a po jedné minutě se doplní na Petriho misku další množství vody. V tomto protokolu se konkrétně jedná o roztok vody a mořské soli v poměru 1g/1L. Úspěšnost IVF protokol uvádí ve výši 28 – 36 % (Harvey et al., 1982).

### **3.6.2. Morris a kolektiv (2003)**

#### **Kryokonzervace**

Hlavní rozdíl od předchozího protokolu spočívá ve způsobu odběru spermií. Využívá se zde disekce varlat a jiný kryoprotektant, konkrétně DMA (N,N-dimethylacetamide).

Protokol využívá dva roztoky. Jeden je ředící a druhý stejný jako ředící, ale s přidaným kryoprotektantem. Na odebraná varlata jedné z ryb je potřeba napipetovat 20  $\mu$ l ředícího roztoku do centrifugační zkumavky umístěné na ledu. Zmrazovací médium je složeno z 11,2% DMA v ředícím roztoku. Roztok DMA v ředícím roztoku by měl být před každým cyklem kryokonzervace čerstvě připraven.

Následuje příprava polystyrenového boxu naplněného suchým ledem. Pro dávku z jednoho samce se připraví 2 zkumavky o objemu 50 ml. Poté se samci anestetizují a usmrtí se. Po usmrcení je provedena pitva. Varlata ze samce jsou umístěna na led do ředícího roztoku a rozdrčena. Do centrifugační zkumavky se přidá 11,2% roztok DMA v ředícím roztoku a promíchává se, dokud se roztoky spolu zcela nesmíchají. Směs se pipetuje do kryovialek na kryokonzervační dávky o objemu 50  $\mu$ l. Celková koncentrace DMA v kryokonzervační dávce je 10 %. Dávky jsou inkubovány po dobu 30 minut na suchém ledu a poté přemístěny do tekutého dusíku (Moris et al., 2003).

## **IVF**

Nejprve se předejde ředící roztok na 37 °C. Odeberou se vajíčka nejméně od 3 samic. To odpovídá přibližně 300-600 vajíčkům. Z tekutého dusíku se vyjme jedna kryovialka a k jejímu obsahu se přidá předeřtý ředící roztok. Oba obsahy se promíchají, dokud se vzorek úplně nerozmrazí. Následně se vzorek aplikuje na vajíčka a ihned se přidá 1 ml vody. Po minutě



se naplní celá miska vodou a inkubuje se při 28,5 °C (Moris et al., 2003). Úspěšnost tohoto protokolu se pohybuje okolo 9 % – 14 % (Yang et Tiersch 2009).

### **3.6.3. Draper a Moens (2009)**

#### **Kryokonzervace**

Pro tento postup je potřeba připravit dva roztoky: ředící roztok, který se liší od předchozího protokolu jen mírně, a mrazící médium, které je složené z ředícího roztoku metanolu a odtučněného mléka.

Odběr spermií se provádí kapilárou z uspaného samce. Úspěšným odběrem se získá 1 µl – 2 µl spermatu, který se naředí do objemu 3,3 µl ředícím roztokem. Kapilára se doplní mrazícím médiem do objemu 20 µl. Následně se obsah kapiláry vypustí do kryovialky, dobře promíchá a rozdělí do dvou kryovialek po 10 µl. Obě kryovialky se přemístí do tub o objemu 15 ml a umístí na 20 minut do suchého ledu. Po dvaceti minutách jsou kryovialky vyjmuty z tub a přesunuty do tekutého dusíku, kde se uchovávají. Důležitá je rychlost práce, od přidání kryoprotektantu až do umístění do suchého ledu nemá uplynout více než 30 sekund (Draper et Moens, 2009).

#### **IVF**

Nejprve se samici odeberou vajíčka. Ve vodní lázni se rozmrazí kryovialky za 8 až 10 sekund. Do kryovialky se přidá 70 µl roztoku 1x E3 média a promíchá se. Následně se přidá obsah kryovialky na vajíčka a okamžitě se doplní o 750 µl roztoku 1x E3 média. Vajíčka se promíchají a inkubují 5 minut v pokojové teplotě. Po pěti minutách se Petriho miska doplní roztokem 1x E3 médiem a inkubuje v 28 °C. Za 2 až 3 hodiny se oplozená embrya přemístí do nové Petriho misky s vodou v počtu 50 vajíček na misku (Draper et Moens, 2009).

Protokol uvádí úspěšnost oplození vajíček 25 % (Draper et Moens, 2009).

### **3.6.4. Matthew a kolektiv (2017)**

Protokol Matthew a kolektiv (2017) vychází ze znalostí předchozích protokolů. Je rozdělen na dvě základní možnosti odběru spermií, a sice na odběr kapilárou a na odběr disekcí varlat. Protokol vytvořil vědecký ústav Zebrafish International Resource Center (ZIRC). Úspěšnost tohoto protokolu v počtu oplozených vajíček IVF dosahuje přibližně 65 %.

Tento protokol nabízí oba možné způsoby odběru.

## **1. Odběr pomocí kapiláry**

Odběr se provádí standardní metodou popsanou výše. Rozdíl je pouze v ředícím roztoku, který je nově doplněn o glukózu jako zdroj energie a HEPES sloužící k vyrovnání pH. Ředící roztok zabrání aktivaci. Mrazit je možné vzorek odebraný od jednoho samce nebo mix od více samců (Matthew et al., 2017).

## **2. Disekce varlat**

Samec se usmrtí a provede se extrakce varlat. Varlata jsou přemístěna do ředícího roztoku v tubě na ledě. Stejným postupem, jak byl popsán výše.

### **Kryokonzervace**

Kryoprotaktant použitý v tomto protokolu je 5% metanol, odstředěné mléko a další složky. Proti starším protokolům nevycházejí složky mrazícího média z ředícího roztoku. Další novinkou je, že roztok se nemíchá ihned před použitím, ale může se namíchat dopředu a skladovat v menších dávkách v -20 °C. S tímto typem kryoprotektantu se musí pracovat velmi rychle. Čím dříve se po spojení RMMB se spermii dostane dávka do suchého ledu, tím lépe (Matthew et al., 2017).

Optimální rychlost mrazení při využití tohoto protokolu je -15 °C za minutu. Stejně rychlosti dosáhneme za použití 15 ml tub a suchého ledu. Do tub se umísťují kryovialky a až poté se přemístí tuby do suchého ledu. Nepoužívá se předchlazení tub. Tuby se uchovávají v suchém ledu 20 až 60 minut (Matthew et al., 2017).

Poměr ředění roztoku s kryoprotektantem je 1:3. Obvykle finální objem kryokonzervační dávky je 20 µl (Matthew et al., 2017).

### **IVF**

Samice jsou izolovány od samců odpoledne den před odběrem vajec. Druhý den ráno probíhá IVF. Samice se před odběrem vysuší, aby nedošlo k aktivaci vajec vodou. Následně probíhá manipulace s vejci a odběr vajec pomocí štětce namočeného do roztoku PBS (Phosphate Buffered Saline (pH 7.4)), který je izotonický (Matthew et al., 2017). Další postup je stejný jako v protokolech uvedených výše.

## **Kontrola kvality**

Kontrola koncentrace spermií se provádí pomocí Bürkerovi komůrky v roztoku E400, ve kterém jsou spermie inaktivní. Další možností je využití spektrometru na stanovení koncentrace spermií popsané výše (Matthew et al., 2017).

Kontrolu motility je výhodné využívat před zmrazením, po zmrazení a následném rozmrazení. Nejlepší možností jsou počítačové systémy CASA (computer assisted sperm analysis). Softwarové systémy poskytují nejobektivnější a nejkompletnější hodnocení. Nicméně pro mrazení spermií postačuje pouze kontrola aktivity spermií pod mikroskopem (Matthew et al., 2017).

## **4. Materiál a metody**

### **4.1. Dánio pruhované**

Samci divokého typu Dánia pruhovaného byli chováni v průtočném recirkulačním systému od firmy Tecniplast v akváriu o objemu 3,8 l společně se samicemi. V každém akváriu bylo umístěno 20 ryb s rozdělením na 10 samců a 10 samic. Do experimentu bylo zařazeno 13 samic a 36 samců. Samice měly stejné podmínky jako samci kromě rozmístění v akváriích. Samice byly rozděleny individuálně do akvárií – vždy jedna samice a dva samci. Účelem byla jasná identifikace samice. Samice byly přirozeně vytřeny 2.6.2017 a poté použity v experimentu. Před využitím dávek skladovaných dva měsíce probíhal druhý přirozený výtěr 27.7.2017. Čtrnáct dní po poslední IVF proběhl poslední kontrolní přirozený výtěr a 7.9.2017 IVF nativním spermatem.

Ryby byly krmeny třikrát denně, ráno a večer vylíhlou žábřonou solnou a v poledne peletovým krmivem Gemma micron 500. Teplota vody byla udržována na 28 °C. Světelný režim byl nastaven na 14 hodin světla denně 7 dní v týdnu.

#### **4.1.1. Přirozený výtěr**

Třináct samic den před přirozeným výtěrem bylo nasazeno do speciálních akvárií, vždy jedna samice na dva samce tak, aby byla od sebe obě pohlaví oddělena. Druhý den ráno, 23.8.2017, byla do akvárií přidána čerstvá voda a vyndána přepážka mezi samicí a samci. Přibližně za dvě hodiny byly ryby vráceny do svých stálých akvárií, vajíčka propláchnuta vodou a přelita na Petriho misky pomocí stříčky s roztokem methylenové modři o koncentraci 0,0001 %. Hodnocení procenta oplozených vajíček probíhalo u každé samice odděleně 24 hodin po oplození.

### **4.2. Odběr spermií a kryokonzervace**

#### **4.2.1. Použité roztoky**

Pokud není uvedeno jinak, všechny chemikálie pochází od Sigma-Aldrich, USA.

#### 4.2.1.1. Sperm Extender ~400 mmol/kg (E400)

Postup přípravy: do jednoho litru roztoku E400 se zamíchaly veškeré ingredience s 800 ml demineralizované vody. První se přidávaly suché ingredience, následně tekuté. Poté se upravila hodnota pH pomocí 5M KOH na 7,9 a doplnila se demineralizovaná voda do konečného objemu jednoho litru. Následovala kontrola osmolality a filtrace roztoku. Roztok E400 se skladoval ve 4 °C. Přesné složení roztoku E400 je uvedeno v Tabulce č. 3.

Tabulka č. 3 – Složení látek pro přípravu 1 litru roztoku E400.

Látka	Množství
HEPES-KOH (pH 7,9)	7,15 g
KCl	9,70 g
NaCl	2,92 g
1M CaCl <sub>2</sub>	2 ml
1M MgSO <sub>4</sub>	1 ml
D-(+)-Glukóza	1,8 g

#### 4.2.1.2. Raffinose Freezing Medium (RMMB)

Pro přípravu 100 ml roztoku RMMB se v kádince o objemu 250 ml smíchalo 20,0 g rafinózy a 70 ml demineralizované vody. Kádinka se umístila na magnetickou míchačku s ohřevem (Thermo Fisher Scientific, USA), současně se zahřála na 70 °C. Po rozpuštění rafinózy se přimíchalo 2,5 g odtučněného mléka, které se nechalo rozpustit. Následně se roztok vychladil na pokojovou teplotu, přidaly se 3 ml 1M Bicine-NaOH (pH 8,0) a 6,67 ml metanolu. Přidala se demineralizovaná voda do finálního objemu 100 ml. Roztok se centrifugoval rychlostí 15 000 x g po 20 minut. Následně se supernatant rozpipetoval do centrifugačních flakonek o objemu 1,5 ml. Do každé flakonky se napipetoval jeden mililitr. Roztok se skladoval v -20 °C do doby, než byl použit. Přesné složení roztoku RMMB je uvedeno v Tabulce č. 4.

Tabulka č. 4 – Složení látek pro přípravu 100 ml roztoku RMMB.

Látka	Množství
Rafinóza pentahydrát	20,0 g
Odtučněné mléko (Difco)	2,5 g
Metanol (Fisher Scientific)	6,67 ml
1M Bicine-NaOH (pH 8)	3 ml

#### 4.2.1.3. Sperm Solution ~300 mmol/kg (SS300)

Na jeden litr roztoku SS300 byl postup přípravy takový, že do 800 ml demineralizované vody se přidaly suché ingredience, roztok se umístil na magnetickou míchačku (Thermo Fisher Scientific, USA), která jej smíchala. Poté se doplnila demineralizovaná voda do finálního objemu 1 litr. Následovala kontrola osmolality a filtrace roztoku. Roztok SS300 se skladoval ve 4 °C. Přesné složení roztoku SS300 je uvedeno v Tabulce č. 5.

Tabulka č. 5 – Složení látek pro přípravu 1 litru roztoku SS300.

Látka	Množství
NaCl	8,2 g
KCl	0,37 g
1M CaCl <sub>2</sub>	1 ml
1M MgSO <sub>4</sub>	1 ml
D-(+)-Glukóza	1,8 g
1M Tris-Cl (pH 8)	20 ml

#### 4.2.1.4. Tricain

Jeden litr roztoku Tricainu se připraví tak, že se do 800 ml demineralizované vody přidaly 4,0 g Tricainu a roztok se promíchal. Hodnota pH se upravila pomocí 1M Tris-Cl (pH 9,0) na hodnotu 7,0 a doplnila se demineralizovaná voda do finálního objemu 1 litr. Roztok se skladoval ve 4 °C. Přesné složení roztoku Tricainu je uvedeno v Tabulce č. 6.

Tabulka č. 6 – Složení látek pro přípravu 1 litru roztoku Tricainu (pH 7).

Látka	Množství
Tricain	4 g
1M Tris-Cl (pH 9)	Dle potřeby

#### 4.2.1.5. Roztok 60x E3 médium

Na jeden litr roztoku 60x E3 média byl postup přípravy následující: do 800 ml demineralizované vody se přidaly veškeré ingredience, roztok se promíchal a doplnila se demineralizovaná voda do finálního objemu 1 litr. Přesné složení roztoku 60x E3 média je uvedeno v Tabulce č. 7.

Tabulka č. 7 – Složení látek v roztoku na přípravu roztoku 60x E3 média.

Látka	Množství
NaCl	17,2 g
KCl	0,76 g
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2,9 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	4,9 g
1 M NaOH	50 µl

#### 4.2.2. Odběr spermií

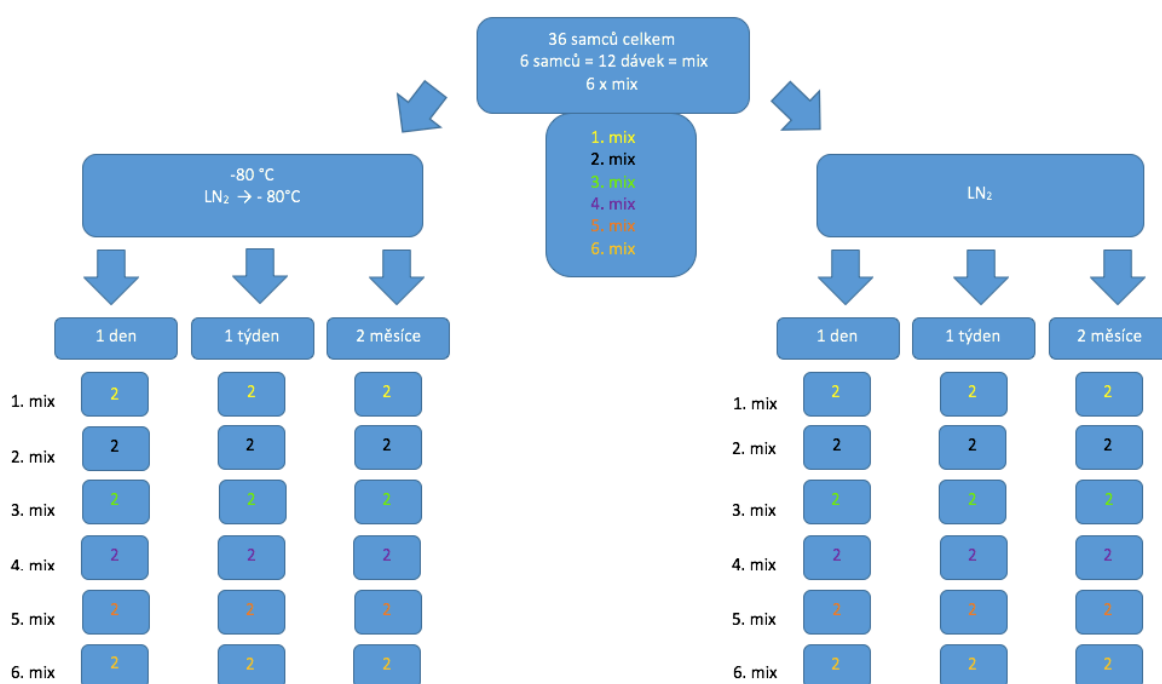
Sběr spermií probíhal 13.6.2017. Do centrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml se připravil roztok E400 o objemu 73 µl a tato zkumavka se umístila na led. Připravilo se 72 kryovialek (2 ml) (Corning, USA) a 36 centrifugačních zkumavek (15 ml). Dále se připravil roztok Tricainu na uspání ryb, síťka na ryby, papírové ubrousky, nůžky s pinzetou na pitvu, box se suchým ledem a nádoba s dusíkem.

Nejprve se uspal jeden samec, který byl následně usmrcen pomocí hypotermie. Pitvou se vyndala varlata a umístila se na led do zkumavky s roztokem E400. Všechna varlata se dávala do předpřipravené centrifugační zkumavky, umístěné na ledu. Pomocí špičky od pipety se varlata v roztoku rozdrtila a nechala se 2 minuty stát na ledě. Poté se tkáň varlat z roztoku odstranila.

### 4.2.3. Kryokonzervace

Směs spermií a E400 se pipetovala do 12 kryovialek po 5  $\mu$ l. Následně se do kryovialek přidalo 15  $\mu$ l kryoprotektantu RMMB. Kryovialky byly ihned uzavřeny, vloženy do centrifugační zkumavky (15 ml) a umístěny do suchého ledu. Po přidání kryoprotektantu byly kryovialky vždy přemístěny na suchý led do 30 sekund a následně po 20-45 minutách do tekutého dusíku.

Jedna polovina kryovialek byla uskladněna v tekutém dusíku, druhá polovina byla po 10 minutách vyjmuta a přemístěna do mrazáku s teplotou  $-80$  °C. Proces zamrazování dvanácti kryokonzervovaných dávek byl opakován šestkrát. Tyto kryokonzervované dávky pocházely vždy od šesti samců, byly rozmístěny do tekutého dusíku a hluboko mrazícího boxu na různě dlouhou dobu (1 den, 1 týden a 2 měsíce) podle následujícího schématu (viz Obrázek č. 10). Schéma zároveň ukazuje, kdy byly jednotlivé kryovialky využity pro IVF.



Obrázek č. 10 – Schéma experimentu ukazující celkový počet použitých samců (36). Na každé mražení je použito 6 samců a vzniká 12 dávek. Tento proces se opakuje 6x, takže celkový počet je 72 kryokonzervovaných dávek. Polovina dávek uskladněna v dusíku a druhá polovina v hluboko mrazícím boxu v  $-80$  °C. Dávky se rozmrazují po 1 dnu, po 1 týdnu a po 2 měsících od zamražení. Vždy se odeberou dvě kryokonzervované dávky z každého ze šesti mrazení, jak z tekutého dusíku, tak z hluboko mrazícího boxu.



## 4.3. IVF

### 4.3.1. Příprava na IVF

Samice byly jeden den před IVF přesunuty do nasazovacích akvárií. V nasazovacím akváriu byla vždy jedna samice oddělena od dvou samců, kde sdíleli společnou vodu, aby mohli být v kontaktu. Druhý den ráno před rozsvícením se nachystaly potřeby pro IVF. Vodní lázeň se nastavila na 38 °C, připravil se roztok Tricainu na uspání ryb, roztok SS300, demineralizovaná voda, síťka na ryby, papírové utěrky, štěteček, časovač, plastová lžička na přemístění ryb a 24 popsaných plastových Petriho misek. Kryovialky umístěné v hluboko mrazícím boxu (-80 °C) a tekutém dusíku (-196 °C) se na danou dobu rozmrazování (1 den, 1 týden, 2 měsíce) přenesly do laboratoře na suchém ledu.

### 4.3.2. IVF

Poté, co se rybám rozsvítilo světlo, se uspala první samice v roztoku Tricainu (5 ml Tricainu na 100 ml 1x roztoku E3 média), ve kterém byla 3-8 minut. Následně se přesunula na papírovou utěrku a usušila se od vody. Suchá samice se přesunula na Petriho misku a pomocí masáže břicha uvolnila vajíčka. Část vajíček bylo přesunuto pomocí štětečku na druhou Petriho misku a samice byla vrácena do akvária s čistou vodou, aby se probudila z anestézie. Současně se ve vodní lázni rozmrazily dvě kryovialky – jedna z hluboko mrazícího boxu (~8 – 12 sekund) a druhá z tekutého dusíku (~12 – 18 sekund). Po rozmražení se do každé kryovialky přidalo 150 µl SS300 a 200 µl demineralizované vody. Směs byla pomocí pipety promíchána a pipetovala se na příslušnou misku mezi vajíčka. Po dvou minutách byla doplněna Petriho miska roztokem methylenové modři o koncentraci 0,0001 %.

Při IVF nativním spermatem byl postup co nejvíce podobný práci s kryokonzervovanými dávkami. Ze směsi spermií v roztoku E400 se odebralo 5 µl, ke kterým se přidalo 150 µl SS300 a 200 µl demineralizované vody. Směs byla pomocí pipety promíchána a pipetována na příslušnou misku mezi vajíčka. Po dvou minutách byla doplněna Petriho miska roztokem methylenové modři o koncentraci 0,0001 %.

Misky byly přemístěny do inkubátoru s teplotou 28 °C.

#### **4.4. Hodnocení úspěšnosti oplození**

Po dvou až pěti hodinách po IVF, nebo po přirozeném oplození, byla vajíčka protříděna na binokulárním mikroskopu Nikon SMZ1270. Špatná vajíčka byla odebrána a jejich počet byl zapsán. Následně byl roztok methylenové modři o koncentraci 0,0001 % vyměněn za čerstvý. Druhý den ráno se embrya přepočítala a na každé misce se zaznamenal počet živých embryí, neoplozených vajíček a embryí zastavených ve vývoji. Tento postup byl opakován jeden den, jeden týden a dva měsíce po zamrazení kryovialek.

#### **4.5. Statistická analýza**

Data byla statisticky vyhodnocena v programu Statistica (ver. 12, StatSoft, ČR). Každému statistickému testu předcházela test homogenity rozptylu a normálního rozdělení dat. Dle výsledků těchto testů byly vybrány konkrétní statistické metody, parametrické (studentův t – test a analýza rozptylu) či neparametrické (Mann – Whitneyův a Kruskal – Wallisův test). Data byla hodnocena na hladině významnosti  $p < 0,05$  a výsledky jsou uváděny jako průměr  $\pm$  SEM.

## 5. Výsledky

### 5.1. Vliv teploty skladování kryokonzervovaných spermií na vývoj embryí po IVF

Úspěšnost skladování kryokonzervovaných dávek v tekutém dusíku (-196 °C) a hluboko mrazícím boxu (-80 °C) je možné pozorovat v níže uvedené Tabulce č. 8. Statistický rozdíl ( $p < 0,05$ ) ve vývoji embryí po IVF kryokonzervovanými dávkami byl pozorován při použití obou metod, přičemž po IVF spermiemi uskladněnými v hluboko mrazícím boxu se téměř žádná embrya nevyvíjela. Při použití spermií skladovaných jeden den v hluboko mrazícím boxu byly vyvinuty pouze 2 embrya z 368. V tekutém dusíku se vyvíjelo průměrně  $12,5 \pm 2,2$  %. Veškeré další výsledky v této práci pocházejí IVF s kryokonzervovanými dávkami skladovanými v tekutém dusíku.

*Tabulka č. 8 – Procento oplozených embryí 24 hodin po oplození spermiemi skladovanými v tekutém dusíku a hluboko mraz boxu (-80 °C).*

	LN <sub>2</sub>	- 80 °C
<b>1 den</b>	$13,4 \pm 3,5^a$	$0,3 \pm 0,3^b$
<b>1 týden</b>	$10,7 \pm 2,5^a$	$0 \pm 0^b$
<b>2 měsíce</b>	$13,4 \pm 5,1^a$	$0 \pm 0^b$
<b>celkem</b>	$12,5 \pm 2,2^a$	$0,1 \pm 0,1^b$

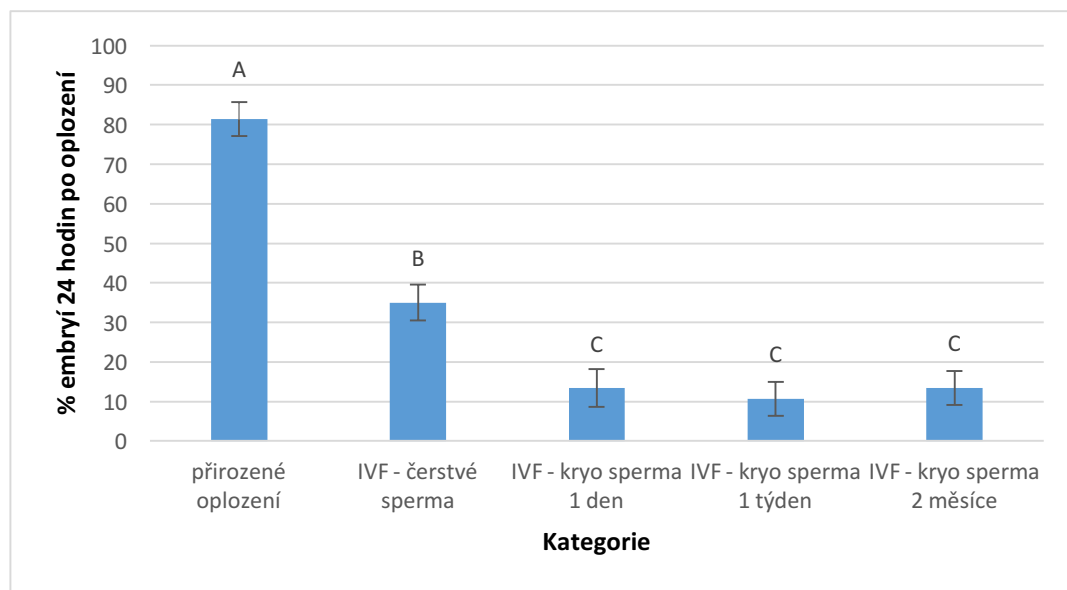
<sup>a, b</sup> rozdílné indexy v řádku označují statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ )

### 5.2. Vliv délky skladování spermií v tekutém dusíku na vývoj embryí po IVF

Hodnocení IVF při použití různého typu spermatu je uvedeno v Grafu 1. Při přirozeném oplození bylo dosaženo úspěšnosti  $81,4 \pm 4,3$  % vyvinutých embryí. Po IVF čerstvým spermatem dosahoval vývoj embryí 24 hodin po oplození úspěšnosti  $35,0 \pm 4,5$  %. Kryokonzervované dávky skladované jeden den dosahovaly úspěšnosti oplození  $13,4 \pm 4,7$  %, dávky skladované jeden týden  $10,7 \pm 4,3$  % a kryokonzervované dávky skladované dva měsíce  $13,4 \pm 4,3$  % (viz Graf č. 1).

Statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) ve vývoji embryí byl zaznamenán mezi porovnáním přirozeného oplození, IVF čerstvým spermatem a s IVF kryokonzervovanou dávkou s třemi sledovanými délkami skladování. Dále byl pozorován statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) ve výsledcích IVF čerstvým spermatem a s IVF kryokonzervovanou dávkou s jakoukoliv sledovanou délkou skladování. Skladování spermatu 1 den, 1 týden 2 měsíce nemělo na výsledek IVF kryokonzervovanou dávkou vliv na vývoj embryí.

Graf č. 1- Procentuální zastoupení embryí 24 hodin po oplození.



<sup>A, B, C</sup> hodnoty označené ve sloupcích grafu odlišným indexem se mezi sebou liší na hladině významnosti  $p < 0,05$

## 6. Diskuze

V této práci se za 24 hodin po oplození vyvinulo  $35,0 \pm 4,5$  % životaschopných embryí po IVF čerstvým spermatem. Harvey a kolektiv (1982) dosáhli po IVF čerstvým spermatem  $76 \pm 6,2$  % vyvinutých embryí za 24 hodin po oplození. Draber a Moes (2009) uvádí úspěšnost IVF čerstvým spermatem více jak 95 % oplozených vajíček, ale není přesně uvedeno stádium vývoje, které ovlivňuje procento embryí, protože vstupují další faktory ovlivňující procento životaschopných embryí. Tato diplomová práce také využívá jiné roztoky než práce uvedené výše.

Průměrné procentuální zastoupení embryí 24 hodin po oplození kryokonzervovaným spermatem skladovaném v tekutém dusíku dosahovalo hodnoty  $12,5 \pm 2,2$  %. Harvey a kolektiv (1982) vytvořili první protokol kryokonzervace spermií Dánia pruhovaného, který měl průměrnou úspěšnost v době klubání embryí  $51 \pm 35,6$  a vychází z něho většina dalších protokolů (Yang et Tiersch, 2009). Nicméně tato úspěšnost je do určité míry zkreslená, neboť dosahuje poměrně široké odchylky a nevychází z celého původního vzorku, ale z kontrolního vzorku IVF čerstvým spermatem. Při přepočítání hodnot získaných během studie této diplomové práce stejným způsobem jako výše bylo získáno procento životaschopných embryí ve výši 40,32 %. Odchylka v tomto případě nebyla dopočítána, neboť se jedná pouze o informativní charakter. Draper a Moes (2009) dosahovali při IVF kryokonzervovanou dávkou spermatu průměrné úspěšnosti 25 % životaschopných embryí, vznikajících při oplodnění z celkového počtu oplodněných vaječ. Avšak tyto protokoly popisují odběr spermií kapilárou. Protokol popisující odběr spermií disekcí varlat byl od Matthews a Carmichael (2015). Ti uvádí úspěšnost více jak 50 %, ale nemají tuto skutečnost podpořenou daty. Tyto odlišné výsledky mohou být důsledkem jiného způsobu odběru spermií pro vytvoření kryokonzervované dávky spermatu. Studie uvedené výše mají výrazně odlišné výsledky a není prozatím jasné, jaký faktor způsobuje tyto odlišnosti.

Výsledek procentuálního zastoupení životaschopných embryí po IVF čerstvým i kryokonzervovaným spermatem je nižší, než uvádí protokoly výše. Procento životaschopných embryí mohly ovlivnit samice horší kvalitou vajíček, taktéž při manipulaci s vajíčky mohlo dojít u části vajíček k poškození. Nutno zdůraznit, že kvalita spermatu je pro IVF také velmi důležitá. U samců mohla tělesná kondice a stáří ovlivnit kvalitu spermií (Hagedorn et Carter,

2011). Samci využití pro tuto diplomovou práci byly jednoho roku stáří, avšak v laboratorní praxi se využívají samci mladší. Navíc výše uvedené výsledky studií neuvádí přesný čas počítání procent životaschopných embryí, a proto se mohl tento čas napříč protokoly lišit, a to mohlo ovlivnit samotnou úspěšnost protokolu.

## **6.1. Vliv teploty skladování kryokonzervovaných spermií na vývoj embryí po IVF**

Při hodnocení vlivu teploty skladování spermií Dánia pruhovaného na životaschopnost embryí 24 hodin po IVF jsme zjistili, že sperma skladované v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v hluboko mrazícím boxu dosahuje průměrně pouze  $0,1 \pm 0,1\%$  životaschopných embryí. Oproti tomu po použití spermatu skladovaného v  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  v tekutém dusíku se vyvinulo průměrně  $12,5 \pm 2,2\%$  životaschopných embryí. Z těchto výsledků je patrné, že sperma Dánia pruhovaného není vhodné skladovat při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro použití na IVF a k tvorbě kryobank spermií.

U Dánia pruhovaného existují pouze studie, které hodnotily úspěšnost IVF za použití kryokonzervovaných dávek a studie hodnotící kvalitativní parametry spermií (Matthew et al, 2018; Yang et al, 2007). Tyto studie ovšem nehodnotily efekt skladování kryokonzervovaných spermií v hluboko mrazícím boxu v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a vliv na následný embryonální vývoj po IVF. U ryby Vyzy velké testovaly vliv krátkodobého skladování kryokonzervovaných dávek spermií v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  na motilitu spermií (Arami et al., 2017). Motilita spermií Vyzy velké byla při jednom dni skladování přibližně 45 %, při dvou dnech skladování téměř 40 % a při třech dnech skladování cca 25 %. Motilita spermií byla statisticky významně snížena ( $p < 0,05$ ) při skladování dva dny, zatímco při šestidenním skladování nebyly v inseminačních dávkách nalezeny motilní spermie (Arami et al, 2017).

U býků testovali Buranaamnuay a kolektiv (2016) vliv teploty ( $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) skladování spermií na kvalitativní parametry spermií po rozmrazení. Byla hodnocena motilita, životaschopnost, integrita plazmatické membrány a stav akrozomu spermií. Ve výsledcích této práce byl zaznamenán významný efekt na životaschopnost a motilitu spermií při skladování v teplotě  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Mezi skladováním v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a v  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v motilitě ani v jednom případě. Avšak při dlouhodobějším skladování v teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  procento životaschopných spermií mírně stoupá, což u teploty  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  není pozorováno (Buranaamnuay et al., 2016). Další parametry, které sledovali Buranaamnuay a kolektiv (2016), jsou integrita plazmatické membrány a stav akrozomu. Integrita plazmatické membrány byla

stejná jak při skladování v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tak  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Skladování v teplotě  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  se opět odlišovalo nižším počtem spermií s nepoškozenou plazmatickou membránou. U stavu akrozomu nebyl pozorován žádný rozdíl mezi teplotami (Buranaamnuay et al., 2016). Z těchto důvodů dospěl Buranaamnuay a kolektiv (2016) k závěru, že býčí sperma zamražené konvenční metodou je možné skladovat při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aniž by byla ohrožena kvalita spermií. Buranaamnuay a kolektiv (2016) v rámci práce také testovali modelový příklad transportu býčí inseminační dávky na suchém ledu. Výsledek byl, že býčí spermie skladované v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  se mohou přesunout do tekutého dusíku a dále skladovat při teplotě  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  bez negativního dopadu na motilitu spermií (Buranaamnuay et al., 2016). Práce Buranaamnuay a kolektiv (2016) poukazuje na zajímavé výsledky kvalitativních změn spermií, ale bohužel nehodnotí jejich dopad na IVF, zatímco tato diplomová práce se zabývá právě IVF.

Pezo a kolektiv (2017) hodnotili kvalitativní parametry spermií psů při skladování v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dospěli k závěru, že je statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi typy skladování. Například motilita rozmrazených psích spermií skladovaných v  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  byla  $41 \pm 1,9\%$  a motilita spermií pocházejících z  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  byla  $34 \pm 1,9\%$ . Nicméně při použití rozmrazených spermií z obou typů skladování na umělou inseminaci pětifer byl výsledek zabřezávání fer stejný tj.  $60\%$  (Pezo et al., 2017). Další zvíře, u kterého se hodnotil vliv teploty skladování spermií, byla laboratorní myš. Raspa a kolektiv (2018) testovali skladování spermií laboratorních myší při teplotách  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Došli k závěru, že při skladování spermií v obou sledovaných teplotách nemá teplota skladování vliv na výsledek IVF, ani na porodnost samic myší (Raspa et al., 2018).

Jak je z výše uvedeného patrné, u savců je možné skladování kryokonzervovaných spermií při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Při jejich rozmrazení dokáží spermie oplodnit vajíčko *in vivo* i *in vitro*. U Dánia pruhovaného jsme došli k jinému výsledku a to, že teplota  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  není vhodná pro IVF. Toto tvrzení podporuje i práce Arami a kolektiv (2017) na Vyze velké. Z toho vyplývá rozdíl mezi savci a rybami, který spočívá v rozdílné hraniční teplotě hraniční teplotě skladování kryokonzervovaných spermií.

## **6.2. Vliv délky skladování spermií v tekutém dusíku na vývoj embryí po IVF**

Kryokonzervované vzorky Dánia pruhovaného skladované jeden den dosahovaly úspěšnosti  $13,4 \pm 4,7\%$  vyvinutých embryí za 24 hodin po oplození. Pokud byly dávky skladované jeden týden, pak vývoj embryí byl  $10,7 \pm 4,3\%$ . Kryokonzervované dávky

skladované dva měsíce měly procento vyvinutých embryí za 24 hodin  $13,4 \pm 4,3$  %. U Dánia pruhovaného délka skladování do dvou měsíců nemá vliv na oplození schopnost spermií kryokonzervovaných spermií a na následný vývoj embryí do 24 hodin po oplození. Tento výsledek se shoduje s experimenty na rybách (Fabbrocini et al., 2015) i savcích (Raspa et al., 2018).

Fabbrocini a kolektiv (2015) hodnotili kvalitativní parametry čerstvých a kryokonzervovaných spermií Mořana zlatého, které byly skladované jeden měsíc a pět let. Studie ukázala, že dlouhodobé skladování nemá efekt na motilitu spermií Mořana zlatého. Suquet a kolektiv (1998) se zabývali délkou skladováním po dobu 9 měsíců kryokonzervovaných spermií v tekutém dusíku Pakambaly velké. Během 9 měsíců nebyl zaznamenán vliv délky skladování na motilitu a oplození schopnost spermií Pakambaly velké. Stejně jako v této diplomové práci procento vyvíjených embryí z IVF nebylo ovlivněno časem skladování. Další studie Liu a kolektiv (2010) skladovali kryokonzervované spermie Mořana japonského 360 dní. Následně u nich byla hodnocena fertilizační schopnost a procento vyklubaných embryí a nebyl pozorován rozdíl v těchto parametrech při dlouhodobém skladování (Liu et al., 2010). Výsledky práce Liu a kolektiv (2010) tedy souhlasí se závěry práce Suquet a kolektiv (1998) a této diplomová práce.

Další práce, která se zabývá kvalitou spermatu po dlouhodobém uchování v tekutém dusíku je studie autorů Liebo a kolektiv (1994), kteří použili na IVF 37 let staré bovinní sperma. Z 670 oocytů se 22 % začalo dělit a pouze 5 % se vyvíjelo do stádia blastocysty. Raspa a kolektiv (2018) testovali vliv skladování spermií laboratorních myší po dobu 2 let na efektivitu IVF. Došli k závěru, že při skladování spermií nemá délka skladování vliv na IVF, ani na porodnost samic myší, jak v tekutém dusíku, tak při teplotě v  $-80$  °C. Dlouhodobým skladováním spermií se zabývají i studie o lidské reprodukci. Například Feldschuh a kolektiv (2005) publikovali, že se čtyřicetileté ženě narodilo dítě pocházející z umělého oplození kryokonzervovaným spermatem starým 28 let, další žena otěhotněla a narodilo se jí dítě umělým oplozením spermatem skladovaným 21 let v tekutém dusíku.

Haugan a kolektiv (2007) zkoumali vliv délky skladování býčích inseminačních dávek na procento zabřeznutých krav po umělé inseminaci. Zjistili, že pokud je inseminační dávka skladována 2,7-5,3 let, není mezi těmito dávkami rozdíl v zabřezávání krav po umělé inseminaci. U skupiny pejet skladovaných delší dobu, konkrétně od 5,3 let do 6,6 let, byl statisticky menší počet zabřezlých krav ( $p < 0,05$ ). Avšak v reálných číslech krávy



ze skupiny skladování od 2,7 do 5,3 dní měly průměrné procento zabřeznutí  $55,5 \pm 0,5$  %, skupina skladovaná od 5,3 do 6,6 dní pouze  $54,1 \pm 0,5$  %. Přestože u inseminačních dávek skladovaných déle jak 5,3 let, dochází ke snížení procenta zabřezávání krav o více než jeden procentní bod, výsledné procento zabřezávání krav po inseminaci dlouhodobě uchovávaných inseminačních dávek v tekutém dusíku v této práci dosahuje stále vysokých hodnot (Haugan et al., 2007).

Malik a kolektiv (2015) zjišťovali účinky dlouhodobého skladování spermatu býka v kapalném dusíku na motilitu, životaschopnost a výskyt abnormalit spermií. V této studii rozmrazovali inseminační dávky skladované v tekutém dusíku po dobu 2, 3, 4, 5 a 6 let. Životaschopnost spermií se významně nelišila. Motilita rozmrazených spermií nebyla významně odlišná při skladování 1, 2 a 3 roky, avšak při delším skladování již byl zaznamenán statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ). Výskyt abnormalit spermií se v rámci délky skladování nelišil do tří let, zatímco u delší doby skladování byly abnormality spermií výrazně zvýšeny ( $p < 0,05$ ) (Malik et al., 2015).

Lessard a kolektiv (2000) zjistili, že délka skladování spermií v kapalném dusíku ovlivňuje hladinu P25b proteinu na povrchu spermií býka, která ovlivňuje navázání spermie na zonu pelucidu vajíčka (Parent et al., 1999). P25b patří do skupiny savčích proteinů spermií, stejně jako lidský P34H (Lessard et al., 2000). Navíc nízké hladiny tohoto proteinu jsou pozorovány u býků s nižší fertilitní schopností (Parent et al., 1999). Lessard a kolektiv (2000) formuloval také hypotézu, že fyzické vibrace mohou způsobit takzvanou fyzikální kryoevoluci povrchových proteinů spermií na rozhraní membránové dvojvrstvy fosfolipidů a extracelulárním ledem.

Z těchto prací vyplývá, že možnosti poškození spermií po několika letech skladování v teplotě  $-196$  °C je genetické poškození, produkce reaktivních druhů kyslíku (ROS) během mrazení, či ztráta povrchových proteinů spermií. Mezi genetická poškození patří například abnormalita struktury chromatinu a integrity DNA (Malik et al., 2015). Produkce reaktivních druhů kyslíku (ROS) během mrazení může způsobit snížení fluidity membrány spermií a snížení funkce spermií po kryokonzervaci (Chatterjee et Gagron, 2001). Ztráta povrchových proteinů spermií je důležitá pro oplození oocyty (Lessard et al., 2000).

Výsledky studií Huagan a kolektiv (2007) a Malik a kolektiv (2015) jsou v rozporu s dalšími názory na dlouhodobé skladování v tekutém dusíku. Například Ashwood-Smith

a Friedmann (1979) předpokládají, že horní hranice pro skladování v tekutém dusíku je nejméně 200 let. Toto tvrzení je podpořeno názorem, že v teplotách pod  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$  nedochází k žádným chemickým reakcím a také, že v tekutém dusíku nejsou možné žádné tepelně řízené reakce (Gao et al., 1997). Reakce, ke kterým může dojít v teplotě  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , jsou fytofyzikální reakce jako například tvorba volných radikálů nebo ionizující záření, které by mohlo být eventuálně faktorem poškozujícím DNA (Mazur, 1984). Nicméně možnost poškození DNA zářením v kontejnerech s tekutým dusíkem je zanedbatelná (Whittingham et al., 1977).

Základem dlouhodobého skladování spermií je samotná práce při odběru spermií, mrazení dávky (Harvey et al., 1982), manipulace s dávkou (Buranaamnuay et al., 2016), teplota a doba rozmrazování dávky (Tri et Tarsisius, 2014). Při dlouhodobém skladování je také velmi důležitá péče o kontejner s tekutým dusíkem a zejména hlídání hladiny spolu s doplňováním tekutého dusíku. Lze předpokládat, že skladování spermií v tekutém dusíku po dobu až desítek let bude mít vliv na následnou IVF rozmrazeným spermatem. Proto je velmi důležité dosáhnout při optimalizaci protokolů pro kryokonzervaci spermií Dánia pruhovaného co nejlepších výsledků IVF kryokonzervovanými dávkami.

## 7. Závěr

Na základě výsledků této práce byly formulovány následující závěry. Dánio pruhované při tření v laboratorních podmínkách dosahovalo přežitelnosti embryí 24 po oplození ve výši  $81,4 \pm 4,3$  %. Po IVF čerstvým spermatem se vyvinulo  $35,0 \pm 4,5$  % embryí a po IVF kryokonzervovanými dávkami spermií se vyvinulo průměrně  $12,5 \pm 2,2$  % embryí.

Pokud se spermie skladovaly v dusíku, výsledek životaschopných embryí 24 hodin po oplození byl  $12,5 \pm 2,2$  %. Pokud se spermie skladovaly v hluboko mrazícím boxu v  $-80$  °C, bylo průměrně vyvinutých embryí 24 hodin po oplození  $0,1 \pm 0,1$  %. Navíc embrya se vyvíjela jen ze spermií skladovaných pouze jeden den a bylo jich minimální množství ( $0,3 \pm 0,3$  %). Proto spermie Dánia pruhovaného nelze skladovat v teplotě  $-80$  °C.

Kryokonzervované dávky spermií skladované v tekutém dusíku jeden den dosahovaly 24 po IVF úspěšnosti  $13,4 \pm 4,7$  % životaschopných embryí, dávky spermií skladované v tekutém dusíku jeden týden  $10,7 \pm 4,3$  % životaschopných embryí a kryokonzervované dávky spermií skladované dva měsíce měly  $13,4 \pm 4,3$  % životaschopných embryí 24 hodin po oplození. Nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl v délce skladování. Spermie Dánia pruhovaného lze kryokonzervovat a uchovávat v tekutém dusíku.

Do budoucna je důležité se zaměřit na optimalizaci protokolu na kryokonzervaci spermií Dánia pruhovaného, aby procento oplozených vajíček a následně procento životaschopných embryí bylo co nejvyšší. Dále, vzhledem k relativně krátké délce skladování, by bylo do budoucna vhodné navázat na tuto práci a porovnat delší časové intervaly skladování, podobně jak to bylo provedeno u býků. Především se zaměřit na délku skladování delší než tři roky.

## 8. Seznam literatury

Agca, Y., Mullen, S., Liu, J., Johnson-Ward, J., Gould, K., Chan, A., Critser, J. 2005. Osmotic tolerance and membrane permeability characteristics of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) spermatozoa. *Cryobiology*. 51. 1-14.

Alavi, S. M. H., Cosson J. 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International*. 29. 101-110.

Aramli, M. S., Nazari, R. M., Aramli, S., Nouri, H. A. 2017. Motility and oxidative–antioxidant capacity of *Huso huso* semen, stored at -80 °C. *Reproduction in Domestic Animals*. 52. 170-173.

Ashwood-Smith, M. J., Friedmann, G. B., 1979. Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage time, and X-irradiation on mammalian cells preserved at -196° in dimethyl sulfoxide. *Cryobiology* 16, 132–140.

Baruš, V., Olivs, O. 1995. *Mihulovci – Petromyzontes a ryby – Osteichthyes*. Fauna ČR a SR. Academia. Praha. 698 s. ISBN: 80-200-0501-3.

Bentley, P. J. 1998. *Comparative vertebrate endocrinology*. Cambridge University Press. Cambridge. UK. p. 562. ISBN: 9780521629980.

Breder, C. M, Rosen, D. E. 1966. *Modes of Reproduction in Fishes*. The Natural History Press. New York. p. 941. ISBN: 0876661207.

Buranaamnuay, K., Seesuwat, K., Saikhun, K. 2016. Preliminary study on effects of bovine frozen semen storage using a liquid nitrogen-independent method on the quality of post-thaw spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 172. 32-38.

Devireddy, R.V., Raha, D., Bischof, J.C., 1998. Measurement of water transport during freezing in cell suspensions using a differential scanning calorimeter. *Cryobiology*. 36. 124-155.

Draper, B. W., McCallum, C. M., Scout, J. L., Slade, A. J., Moens, C. B. 2004. A high-throughput method for identifying N-Ethyl-N-Nitrosourea (ENU)-induced point mutations in zebrafish. In: Detrich, H. W., Westerfield, M., Zon, L. I. (Eds.). *The Zebrafish: Genetics*

Genomics, and Informatics. Methods in Cell Biology. Elsevier Press. San Diego. p. 91-112. ISBN: 9780080888576.

Draper, B.W., Moens, C. B. 2009. A High-Throughput Method For Zebrafish Sperm Cryopreservation and In Vitro Fertilization. Journal of Visualized Experiments. 29.

Dvořák, P., Pyszko, M., Velíšek, J., Líšková Dvoříková, Z., Andreji, J. 2014. Anatomie a fyziologie ryb. Jihočeská univerzita. Vodňany. 189 s. ISBN: 978-80-87437-80-3.

Fabbrocini, A., Adamo, R. D., Pelosi, S., Oliveira, L. F. J., Prete, F., Silvestri, F., Vitiello, V., Sansone, G. 2015. Sperm motility evaluation following long-term storage (5 years) of cryopreserved sea bream (*Sparus aurata* L., 1758) semen. Journal of Applied Ichthyology. 31. 104-107.

Feldschuh, J., Brassel, J., Durso, N., Levine, A. 2005. Successful sperm storage for 28 years. Fertility and Sterility. 84. 3-4.

Fribourgh, J. H., McClendon, D. E., Soloff, B. L. 1970. Ultrastructure of the goldfish. Copeia. 6. 274-279.

Gao, D., Mauzer, P., Crister, J.K. 1997. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Karow, A.M., Crister, J.K. (Eds.). Reproductive Tissue Banking. Academic Press. New York. p. 263-328. ISBN: 9780080540542.

Gerlach, G. 2006. Pheromonal regulation of reproductive success in female zebrafish: Female suppression and male enhancement. Animal Behaviour. 72. 1119-1124.

Gerlach, G., Lysiak, N. 2006. Kin recognition and inbreeding avoidance in zebrafish, *Danio rerio*, is based on phenotype matching. Animal Behaviour. 71. 1371-1377.

Gilmore, J. A., McGann, L. E., Liu, J., Gao, D. Y., Peter, A. T., Kleinhans, F. W., Critser, J. K. 1995. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. Biology Reproduction. 53. 985-995.

Ginsburg, A. S. 1963. Sperm-egg association and its relationship to the activation of the egg in salmonid fishes. Journal of embryology and experimental morphology. 11. 13-33.

- Ginzburg, A. S. 1968. Fertilization of fishes and the problem of polyspermy. Academy of Science USSR. New York. p. 354. ISBN: 39088001835313.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Odenthal, J., van Eeden, F. J., Jiang, Y. J., Heisenberg, C. P., Kelsh, R. N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C., Nusslein-Volhard C. 1996. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. Development. 123. 1-36.
- Hagedorn, M., Carter, V. L. 2011. Zebrafish Reproduction: Revisiting In Vitro Fertilization to Increase Sperm Cryopreservation Success. PLoS ONE. 6. 6.
- Hagedorn, M., Ricker, J., McCarthy, M., Meyers, S. A., Tiersch, T. R., Varga, Z. M., Kleinhans, F. W. 2009. Biophysics of zebrafish (*Danio rerio*) sperm. Cryobiology. 58. 12-19.
- Harder, W. 1975. Anatomy of fishes Part I: Text. E. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart. Germany. p. 612. ISBN: 978-3-510-65067-5.
- Harper, C., Lawrence, C. 2016. The Laboratory Zebrafish. CRC Press. Boca Raton. p. 239. ISBN: 9781439807446.
- Harvey, B., Norman, K. R., Ashwood-Smith, M. J. 1982. Cryopreservation of zebrafish spermatozoa using methanol. Canadian Journal Zoology. 60. 1867-1870.
- Haugan, T., Grohn, Y. T., Kommisrud, E., Ropstad, E., Reksen, O. 2007. Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow conception. Animal Reproduction Science. 97. 1-11.
- Haugan, T., Grohn, Y. T., Kommisrud, E., Ropstad, E., Reksen, O. 2007. Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow conception. Animal Reproduction Science. 97. 1-11.
- Hisaoka, K. K., Battle, H. I. 1958. The normal developmental stages of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). Journal of Morphology 102. 311-323.
- Chang, A. M. 2013. In vitro fertilization. Magill's Medical Guide (Online Edition).

- Chatterjee, S., Gagnon, C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development*. 59. 451-458.
- Chen, L. C., Martinich, R. L. 1975. Pheromonal stimulation and metabolite inhibition of ovulation in zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Fishery Bulletin*. 73. 889-894.
- Christen, R., Schackmann, R., Shapiro, B. M. 1983. Metabolism of sea urchin sperm: interrelationships between intracellular pH, ATPase activity and mitochondrial respiration. *Journal of Biological Chemistry*. 258. 5392-5399.
- Kimmel, CH. B., Ballard, W. W., Kimmel S. R. Ullman, B., Schilling, T. F. 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental dynamics*. 203. 253-310.
- Knight, J., Abbot, A. 2002. Full house. *Nature*. 417. 785-786.
- Kouřil, J., Hamáčková, J., Hulová, I., Barthová, J. 1999. Hormonální ovulace u kapra pomocí čistěného extraktu kapří hypofýzy. *Edice Metodik. VÚRH JU. Vodňany*. č. 64. 4 s.
- Kůs, E. 2008. *Ryby*. Aventinum s.r.o. Praha. 255 s. ISBN: 978-80-86858-74-6.
- Leal, M. C., Cardoso, E. R., Nobrega, R. H., Batlouni, S. R., Bogerd, J., Franc, L. R., Schulz, R. W. 2009. Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generation. *Biology Reproduction*. 81. 177-187.
- Lessard, C., Parent, S., Leclerc, P., Bailey, J. L., Sullivan, R. 2000. Cryopreservation Alters the Levels of the Bull Sperm Surface Protein P25b. *Journal of Andrology*. 21. 700-707.
- Liebo, S. P., Semple, M. E., Kroetsch, T. G. 1994. In vitro fertilization of oocytes by 37 year old cryopreserved bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 42. 1257-1262.
- Liu, Q. H., Chen, Y. K., Xiao, Z. Z., Li, J., Xu, S. H., Shi, X. H. 2010. Effect of storage time and cryoprotectant concentrations on the fertilization rate and hatching rate of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major* Temminck & Schlegel, 1843). *Aquaculture Research*. 41. 89-95.

- Malik, A., Laily, M., Zakir, M. I. 2015. Effects of long term storage of semen in liquid nitrogen on the viability, motility and abnormality of frozen thawed Frisian Holstein bull spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 4. 22-25.
- Matthews J. L., Murphy, J. M., Carmichael, C., Varga, Z. M. 2017. ZIRC E400/RMMB Sperm Cryopreservation and IVF Protokol [online]. 18. července 2017 [cit. 2018-01-14]. Dostupné z <<https://zebrafish.org/documents/protocols.php>>.
- Matthews, J. L., Carmichael, C. 2015. ZIRC E400/RMMB Sperm Cryopreservation Protokol [online]. 30. července 2015 [cit. 2017-01-13]. Dostupné z <<https://zebrafish.org/documents/protocols.php>>.
- Matthews, J. L., Murphy, J. M., Carmichael, C., Yang, H., Tiersch, T., Westerfield, M., Varga, Z. M. 2018. Changes to Extender, Cryoprotective Medium and In Vitro Fertilization Improve Zebrafish Sperm Cryopreservation [online]. *Zebrafish*. 25. ledna 2018 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1521>>.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*. 247. 125-142.
- Menke, A. L., Spitsbergen, J. M., Wolterbeek, A. P. M., Woutersen, R. A. 2011. Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. *Toxicologic Pathology*. 39. 759-775.
- Morris, J. P., Berghmans, S., Zahrieh, D., Neuberger, D. S., Kanki, J. P., Look, A. T. 2003. Zebrafish sperm cryopreservation with N, N-dimethylacetamide. *Biotechniques*. 35. 956-968.
- Nagahama, Z. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Development Biology*. 38. 217-229.
- Parent, S., Lefievre, L., Brindle, Y., Sullivan, R. 1999. Bull subfertility is associated with low levels of a sperm membrane antigen. *Molecular Reproduction and Development*. 52. 57-65.
- Pezo, F., Cheuquemán, C., Salinas, P., Risopatrón, J. 2017. Freezing dog semen using -80 °C ultra-freezer: Sperm function and in vivo fertility. *Theriogenology*. 99. 36-40.
- Raspa, M., Fray, M., Paoletti, R., Montoliu, L., Giuliani, A., Scavizzi, F. 2018. Long term maintenance of frozen mouse spermatozoa at -80 °C. *Theriogenology*. 107. 41-49.



- Roberts, R. J. 2011. Fish Pathology. Wiley-blackwell. Philadelphia. p. 590. ISBN: 978-1-444-33282-7.
- Rocha, M. J., Arukwe, A., Kapoor, B. G. 2008. Fish reproduction. CRC Press. USA. p. 632. ISBN: 1578083311.
- Saxena, R. K., Saxena, K. 2008. Comparative Anatomy of Vertebrates. Anshan. Kent. USA. p. 479. ISBN: 978-1905740994.
- Selman, K., Wallace, R. A., Sarka, A., Qi, X. P. 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish *Brachydanio rerio*. Journal of Morphology. 218. 203-224.
- Schlenk, W., Kahmann, H. 1938. The chemical composition of seminal fluids and their physiological importance study with trout sperm. Biochemistry Zoology. 295. 283-301.
- Spence, R., Fatema, M. K., Reichard, M., Huq, K. A., Wahab, M. A., Ahmed, Z. F., Smith, C. 2006. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. Journal of Fish Biology. 69. 1435-1448.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. Biological Reviews. 83. 13-34.
- Spence, R., Smith, C. 2005. Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*. Animal Behaviour. 69. 1317-1323.
- Suquer, M., Dreanno, G., Petton, B., Normant, Y., Omnes, M., Billard, R. 1998. Long-term effects of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. Aquatic Living Resources. 11. 45-48.
- Tiersch, T. R., Mazik, P.M., 2000. Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. ISBN: 978188880702.
- Tri, U., Tarsisius, C. T. 2014. The Effect of Thawing Temperature on Sperm Quality of Friesian Holstein Bulls. Jurnal Sain Veteriner. 32. 1.
- Vandenhurk, R., Lambert, J. G. D. 1983. Ovarian-steroid glucuronides function as sex-pheromones for male zebrafish, *Brachydanio rerio*. Canadian Journal of Zoology – Revue

Canadienne de Zoologie. 61. 2381–2387.

Westerfield, M. 2000. The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). University of Oregon Press. Oregon. p. 252. ISBN: 9994860577.

Whittingham, D. G., Lyon, M. F., Glenister, P. H. 1977. Long-term storage of mouse embryos at -196° C: the effect of background radiation. Genetics Research Cambridge. 29. 171-181.

Williot, P., Kopeika, E. F., Goncharov, B. F. 2000. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). Aquaculture. 189. 53-61.

Williot, P., Kopeika, E. F., Goncharov, B. F. 2000. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). Aquaculture. 189. 53-61.

Willoughby, C.E., Mazur, P., Peter, A.T., Critser, J.K. 1996. Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa. Biology Reproduction. 55. 715-727.

Wilson-Leedy, J. G., Kanuga, M. K., Ingermann, R. L. 2009. Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility. Theriogenology. 79. 1054-1062.

Withers, P.C. 1992. Comparative Animal Physiology. Saunders Collage Publishing. Philadelphia. USA. p. 949. ISBN: 0030754038.

Yadav, M. 2008. Fish Endocrinology. Discovery Publishing House. New Delhi. India. p. 296. ISBN: 9781578083183.

Yang, H., Carmichael, C., Varga, Z.M., Tiersch, T.R. 2007. Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*. Theriogenology. 68. 128-136.

Yang, H., Tiersch, T. R. 2009. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and Xiphophorus. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 149. 224-232.

Yaron, Z. 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*. 129. 49-73.

Zhang, L., Wang, S., Chen, W., Hu, B., Ulah, S., Zhang, Q., Le, Y., Chen, B., Yang, P., Bian, X., Yi, L., Chen, Q., Lin, J., Gao, C., Hu, J. 2014. Fine structure of zebrafish (*Danio rerio*) spermatozoa. *Pakistan Veterinary Journal*. 34. 518-521.