

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra, veterinárních disciplín**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Kryokonzervace spermií volně žijících druhů zvířat**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Alexandr Jestřáb**

**Obor: Chovatelství**

**MVDr. Romana Krejčířová, Ph.D.**

**© 2020 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Kryokonzervace spermií volně žijících druhů zvířat " jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

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

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval MVDr. Romana Krejčířová, Ph.D.

# Kryokonzervace spermií volně žijících druhů zvířat

## Souhrn

Kryokonzervace byla popsána jako metoda pro uchování spermií, vajíček nebo embryí pro jejich pozdější využití. Principem této metody je provedení postupného ochlazování až na teplotu  $-196^{\circ}\text{C}$  s použitím kryoprotektiva, což je speciální kryokonzervační médium pro uchování životaschopnosti reprodukčních buněk v tekutém dusíku při velmi nízké teplotě tak, aby nedošlo k jejich destrukci.

Cílem procesu kryokonzervace je zabránit tvorbě ledových krystalů a dehydrataci buňky. V okamžiku, kdy se teplota blíží bodu mrazu, se začínají tvořit mimo buňku (extracelulární prostor) ledové krystaly a vytvářet tak osmotickou nerovnováhu.

Nerovnováha má za následek dehydrataci buněk. Následky způsobené dehydratací a krystalizací lze minimalizovat kontrolou rychlosti chlazení, používání kryoprotektivních látek, udržování vhodných skladovacích teplot a kontrolou rychlosti rozmrazení.

Při metodě pomalého mrazení jsou buňky vloženy do vhodného mrazicího média, kde jsou ponechány různý časový interval (záleží na samotném zvířeti) až do úplného proniknutí kryoprotektiv do buňky a poté chlazeny. Tvorba ledu nemusí nutně začít při dosažení bodu mrazu.

Buňky podstupující kryokonzervaci musí odolat řadě velkých a náhlých teplotních změn. V nezmrzlé frakci čelí velmi vysoké koncentraci rozpuštěných látek, které mohou být toxická. Dehydratace a vysoká koncentrace solí zapříčiňují ztrátu stability v membránách nebo denaturaci proteinů.

Jako vitrifikace se označuje proces vedoucí k přeměně z kapaliny na pevnou látku bez krystalizace. Vitrifikační metody zahrnují použití média, které má na začátku velmi vysokou hodnotu koncentrace rozpuštěných solí. Led se tedy nemůže tvořit v žádné části vzorku.

Mnoho živočišných druhů je na pokraji vyhubení, nebo je silně ohroženo. Proto využíváme metody, prodlužující uchovávat genetický materiál, který umožňuje jejich reprodukci. Jako je kryokonzervace.

Kryokonzervace spermatu je v současnosti již běžnou praxí.

Podmínkou provedení kryokonzervace spermií je použití vhodné metody pro získání ejakulátu. Sběr spermatu pomocí umělé vagíny, je nejčastější technika používaná u domácích zvířat, zejména u skotu (Bhattacharya et al. 2009) a koní. Další možností získání ejakulátu je

sběr postkoitálních spermií Tato metoda zachycuje pouze část vyprodukovaného celkového množství spermatu. Sperma může být odebráno přímo ze samičího reprodukčního traktu, může být také sbíráno pomocí vaginálního kondomu.

Standartní sběrnou technikou u naprosté většiny divoce žijících druhů savců, za současného použití anestezie se stala metoda elektroejakulace.

Zajímavou alternativou pro neinvazivní odběr spermatu je použití rektální manuální stimulace přídatných pohlavních žláz. Výhodou metody není nutností použití anestezie, která je těžko indikovatelná u volně žijících druhů zvířat.

Mezi invazivní metody odběru ejakulátu je řazen odběr spermatu post mortem nebo po kastraci. Pro získání kvalitních spermií je velmi nejdůležitě zkrátit čas mezi úhynem zvířete či kastrací a odběrem spermatu.

Metodou používanou při získávání spermatu kohoutů je masážní technika v oblasti páteře.

U plazů, podobně jako u ryb, je sperma nejčastěji odebíráno využitím techniky břišní masáže.

**Klíčová slova:** spermie, kryokonzervace, vitifikace, volně žijící zvířata

# Cryopreservation of sperm cells of wildlife species

## Summary

Cryopreservation has been described as a method for preserving sperm, ova or embryos for later use. The principle of this method is to perform gradual cooling down to  $-196^{\circ}\text{C}$  using a cryoprotectant, which is a special cryopreservation medium for maintaining the viability of reproductive cells in liquid nitrogen at a very low temperature so that they are not destroyed.

The aim of the cryopreservation process is to prevent the formation of ice crystals and dehydration of the cell. As the temperature approaches freezing, ice crystals begin to form outside the cell (extracellular space), creating an osmotic imbalance.

Imbalance results in cell dehydration. The consequences of dehydration and crystallization can be minimized by controlling the cooling rate, using cryoprotectants, maintaining appropriate storage temperatures, and controlling the thawing rate.

In the slow freezing method, the cells are placed in a suitable freezing medium, where they are left for a different time interval (depending on the animal itself) until the cryoprotectants completely penetrate the cell and then cooled. Ice formation does not necessarily start when the freezing point is reached.

Cells undergoing cryopreservation must withstand a number of large and sudden temperature changes. In the unfrozen fraction, they face very high concentrations of solutes, which can be toxic. Dehydration and high salt concentrations cause loss of membrane stability or denaturation of proteins.

Vitrification is the process of converting from a liquid to a solid without crystallization. Vitrification methods involve the use of a medium that initially has a very high concentration of dissolved salts. Thus, ice cannot form in any part of the sample.

Many animal species are on the verge of extinction or are highly endangered. Therefore, we use methods that prolong the storage of genetic material that allows their reproduction. Such as cryopreservation.

Cryopreservation of sperm is now a common practice.

The condition for cryopreservation of sperm is the use of a suitable method for obtaining ejaculate. Sperm collection using an artificial vagina is the most common technique used in domestic animals, especially cattle (Bhattacharya et al. 2009) and horses. Another way to obtain ejaculate is to collect postcoital sperm. This method captures only a part of the total amount of

sperm produced. Sperm can be collected directly from the female reproductive tract, it can also be collected using a vaginal condom.

The method of electroejaculation has become the standard collection technique for the vast majority of wild mammal species, with the simultaneous use of anesthesia.

An interesting alternative for non-invasive sperm collection is the use of rectal manual stimulation of the accessory gonads. The advantage of the method is not the need to use anesthesia, which is difficult to indicate in wild species.

Invasive methods of ejaculate collection include post-mortem or post-castration sperm collection. To obtain quality sperm, it is very important to shorten the time between the death of the animal or castration and the collection of sperm.

The method used in obtaining sperm from roosters is a massage technique in the area of the spine.

In reptiles, similar to fish, semen is most often collected using the technique of abdominal massage.

**Keywords:** sperm, cryopreservation, vitrification, wild animals

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce.....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Kryokonzervace .....</b>	<b>3</b>
<b>3.2</b>	<b>Historie.....</b>	<b>4</b>
3.2.1	Historie kryokonzervace v České republice .....	5
<b>3.3</b>	<b>Získávání ejakulátu volně žijících zvířat .....</b>	<b>6</b>
3.3.1	Odběr ejakulátu u savců .....	6
3.3.2	Odběr ejakulátu u ptáků .....	9
3.3.3	Odběr ejakulátu u plazů a obojživelníků .....	9
3.3.4	Odběr ejakulátu u ryb .....	10
<b>3.4</b>	<b>Metody mražení .....</b>	<b>10</b>
<b>3.5</b>	<b>Kryoprotektiva.....</b>	<b>14</b>
3.5.1	Toxicita kryoprotektiv .....	15
<b>3.6</b>	<b>Poškození kryokonzervací .....</b>	<b>16</b>
<b>3.7</b>	<b>Kryokonzervace gamet.....</b>	<b>17</b>
<b>3.8</b>	<b>Příklady kryokonzervace ejakulátu některých volně žijících zvířat .....</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>24</b>



# 1 Úvod

V současné době lze díky možnosti dlouhodobého uchování genetického materiálu zvýšit možnost přežití mnoha ohrožených druhů zvířat. Z tohoto důvodu ve spojení s metodami umělé inseminace je kladen velký důraz na vývoj technik a metodik kryokonzervace ejakulátu různých druhů nejen hospodářských, ale i divokých druhů zvířat (Pegg 2002).

Vzhledem rychlému rozvoji v oblasti reprodukčních technologií (umělé oplodnění, gameto/embryomikromanipulace, sexování spermií) je možné uchovaný genetický materiál, získaný od různých druhů zvířat, který lze využívat i za účelem ochrany diverzity (Santiago-Moreno et al. 2013).

Spermie v porovnání s oocyty a embryi jsou mnohem dostupnějším materiálem, relativně se snado dají získat i ve velkém počtu. Jsou dlouhodobě uchovatelné, což z nich činí velmi důležitý potenciál genetické informace, používaný v úložištích genomových zdrojů (Sipek et al. 2019).

Kryokonzervace spermií umožňuje jejich použití pro inseminaci samic spermatem samců již uhynulých, kvalitních z hlediska uchování vlastností druhu či plemene. Což poskytuje možnost zachování či i zvýšení genetické diverzity dané populace zvířat (Pratt 2017).

## **2 Cíl práce**

Cílem této bakalářské práce bylo sepsat literární rešerši s informacemi o možnostech kryokonzervace se zaměřením na kryokonzervaci spermatu volně žijících zvířat. Na základě prostudované dostupné odborné literatury byly shrnuty nejčastěji používané kryokonzervační postupy a jejich principy.

Vzhledem k velké druhové rozmanitosti zvířat, u kterých je kryokonzervace prováděna, byly do rešerše bakalářské práce zařazeny i informace o způsobech získání ejakulátu nejen u savců, ale velmi stručně byly zmíněny i metody používané u ptáků, obojživelníků, hadů a ryb.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Kryokonzervace

Kryokonzervace je metoda pro uchování spermií, vajíček nebo embryí pro jejich pozdější využití. Principem této metody je provedení postupného ochlazování až na teplotu  $-196^{\circ}\text{C}$  s použitím kryoprotektiva, což je speciální médium pro uchování reprodukčních buněk v tekutém dusíku při velmi nízké teplotě. Je tedy nutné vytvořit specifické podmínky, protože pokud je živý biologický materiál vystaven nízkým teplotám, dochází k destrukci buněk (Pegg 2007). Ochlazování má za následek mrznutí kapaliny, což se projevuje zvyšováním koncentrace látek rozpuštěných ve zbývající kapalně fázi. Teorie poškození mrazem předpokládají, že ledové krystaly poškodí nebo dráždí buňky. Ničí je tedy přímým mechanickým působením, nebo je poškození způsobeno sekundárními účinky prostřednictvím změn ve složení kapalně fáze. Kryoprotektanty zvyšují celkovou koncentraci všech rozpuštěných látek v systému snižují množství ledu vytvářeného při jakékoli dané teplotě, ale aby byly biologicky přijatelné, musí být schopny proniknout do buněk a současně musí být málo toxické. Některé ze sloučenin disponují požadovanými vlastnostmi, jako příklad lze uvést glycerol, dimethylsulfoxid, ethandiol, či propandiol (DeVries 1983). Podle získaných poznatků je intracelulární zmrazení nebezpečné, zatímco extracelulární led je pro biologický materiál neškodný. Je-li známa propustnost buněčné membrány pro vodu, je možné předpovědět účinek rychlosti ochlazování na přežití buněk a optimální rychlost kryokonzervace pak bude kompromisem mezi rizikem intracelulárního zmrazení a účinky koncentrovaných roztoků. Ani extracelulární led však není neškodný vždy. Při tvorbě extracelulárního ledu nastává poškození intracelulárních kanálků buněčné stěny. U komplexních mnohobuněčných systémů je nezbytné nejen zajistit přežití buněk, ale také zabránit poškození extracelulárních buněčných struktur. Tento problém řeší moderní metoda kryokonzervace – vitrifikace. Při jejím použití dochází ke skokovému ochlazení reprodukčních buněk na teplotu  $-196^{\circ}\text{C}$  řádově v sekundách (Fahy & Wowk 2007). Využívá se při tom média obsahujícího vysoké dávky kryoprotektivních látek, chránících buňky před poškozením. Dojde k vytvoření sklovité hmoty, která je definována viskozitou dosahující dostatečně vysoké hodnoty, aby se chovala jako pevná látka, ale bez jakékoli krystalizace. Při použití vitrifikačních metod je hlavním problémem toxicita sloučenin využívaných jako kryoprotektanty (Fahy et al. 1984). Jak v případě konvenční kryokonzervace tak při vitrifikaci je nutné, aby kryoprotektant prostoupil celou strukturou kryokonzervovaného materiálu. Existuje mnoho možností, jak roztoky pronikají do buněk. Mezi základní způsoby

pronikání roztoku a látek v nich rozpuštěných je řazena osmóza a difúze. Tyto dva základní procesy pronikání do buněk jsou nejrizikovějšími faktory při rozmrazování a zmrazování (Pegg 2007).

## 3.2 Historie

Uchovávat buňky prostřednictvím kryokonzervace bylo umožněno díky schopnosti glycerolu chránit buňky před mrazem. Vývoj kryokonzervačních technik měl obrovský dopad v mnoha oborech, zejména v reprodukční medicíně. Přesto se první pokusy související s kryokonzervací datují poměrně daleko do minulosti. První zmínky o pokusech, které zjišťovaly účinky chladu na živé organismy, je možné najít již v 17. století. V té době Robert Boyle, který byl významným anglickým vědcem, napsal odborný spis „New Experiments and Observations Touching Cold“ (Hunter & Boyle 2020). V 2. polovině 19. století britský vědec Michael Foster zkoumal vliv snižování teploty pod fyziologické rozhraní a jejího opětovného zvyšování na životaschopnost organismu (Fuller 2003). Další milníky v kryokonzervaci vytvořili v roce 1930 Walton a Hammond, kteří se zabývali působením teploty na králičí spermie. V roce 1938 Jahnel ochladil sperma na  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$  a Luyet a Hoddapp provedli oživení spermií vitrifikovaných v tekutém vzduchu. V roce 1940 Shettles zmrazil sperma při  $-269\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Sztein 2016).

Skutečný počátek kryokonzervace se datuje rokem 1948, kdy anglický biolog C. Polge vyřešil problém jak uchovat živé buňky a tkáně při velmi nízkých teplotách. Náhodně objevil kryoprotektivní vlastnosti glycerolu, když se podařilo zajistit přežívání kohoutích spermií zmrazených na  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Polge také docílil vysokého procenta zabřeznutí u skotu při použití spermatu, které bylo zmrazeno déle než jeden rok. Tyto poznatky měly velký vliv na budoucí vývoj umělého oplodnění a zlepšení genetického fondu u hospodářských zvířat (Pegg 2002).

V roce 1953 Jerome K. Sherman na University of Iowa prováděl výzkum, jehož výsledkem bylo úspěšné zmrazení a rozmrazení lidských spermií, což vedlo k založení první spermabanky na světě, a následně k prvnímu úspěšnému oplodnění vajíčka za použití zmrazených dárcovských spermií s normálním průběhem jeho vývoje. Vzhledem ke konzervativním postojům tehdejší společnosti se však první dítě narodilo až deset let po tomto objevu (Ombelet & Van Robajns, 2020).

V roce 1964 se začal používat pojem kryobiologie. Vznikl sloučením slov „kryo“ = zima, „bios“ = život a „loga“ = věda. Kryobiologie je tedy vědou zkoumající biologickou aktivitu a architekturu buněk ovlivněných nízkými teplotami. Teploty se často pohybují od

hypotermických po kryogenní hodnoty. Hypotermické skladování probíhá obvykle při teplotách nad 0°C, avšak bez dosažení normotermických hodnot (32 – 37°C). Při kryokonzervaci je využíváno teplotního rozmezí – 80°C až -196°C. V roce 1964 byla založena Společnost pro kryobiologii „The Society for Cryobiology“, díky níž došlo k propojení biologických, lékařských a fyzikálních věd, které společně zkoumají vliv nízkých teplot na biologické systémy (societyforcryobiology.org 2020).

Další vývoj kryokonzervace je spojen s vývojem postupů a technik v asistované reprodukci. Australský biolog Alan Trounson v roce 1983 úspěšně provedl implantaci lidského embrya, které bylo zmrazeno tři dny po oplodnění. V roce 1986 australský biolog Christopher Chen jako první úspěšně zmrazil a rozmrazil lidské oocyty. V roce 1988 francouzský biolog Yves Menezo připravil první komerční kultivační médium používané při oplodnění in vitro. Navrhl také novou metodu kultivace, která embryím umožnila úspěšně růst 5 nebo 6 dní v inkubátoru a dosáhnout fáze blastocysty. Prezentoval zmrazení a rozmrazení blastocyst, po kterém došlo k úspěšnému těhotenství. V roce 1993 italský biolog Gianpiero Palermo získal první embrya po intracytoplazmatické injekci spermatu, což umožnilo otcovství i těm jedincům, kteří produkují velmi malé množství spermií (History of Cryopreservation 2020).

### 3.2.1 Historie kryokonzervace v České republice

Využívání kryokonzervace jako metody k uchování biologického materiálu v tehdejší Československu velice úzce souvisí s existencí Tkáňové ústředny, která byla založena roku 1952 Rudolfem Klenem v Hradci Králové. Jak uvádí Měřička (2008), doktor Klen ji definoval jako tkáňovou banku specializovanou na odběr, konzervaci, skladování a distribuci různých druhů tkání, odebíraných od žijících nebo zemřelých dárců, pro klinické i experimentální použití. Šlo o velice pokrokovou událost, protože v té době jediná tkáňová banka fungovala jako tajný projekt válečného námořnictva ve Spojených státech amerických. Postupně byly metody využívané ke konzervaci tkání rozvíjeny. V Tkáňové ústředně byla metoda chemické konzervace nahrazena metodami využívajícími ke konzervaci nízkých teplot (Zajíčková 2015).

Pro kryokonzervaci a další metody uchování tkání a buněk pomocí nízkých teplot a jejich rozvoj je nezbytné technické vybavení. V šedesátých letech vyrábělo biologické kontejnery pro nízkoteplotní konzervaci pouze několik desítek firem na světě. V Československu jím byl podnik Ferox Děčín, který od roku 1966 vyráběl biologické kontejnery pro potřeby kryobiologického skladování a přepravy.

Účinkům nízkých teplot se věnovali nejen odborníci z humánní medicíny, ale i odborníci z oblasti rostlinné a živočišné produkce a výzkumu. V roce 1969 byla vytvořena „Sekce pro biologii nízkých teplot“ v České biologické společnosti, jež existuje do dnešní doby. Sdružuje zhruba 70 členů a spolupracuje s anglickou The Society for Cryobiology (Zajíčková 2015).

Také v Československu vývoj kryokonzervace souvisel, stejně jako v okolních zemích, s vývojem v oblasti asistované reprodukce. První dítě se v Československu za použití metody in vitro narodilo pouze 4 roky po světovém prvenství, v roce 1982 (Zajíčková 2015).

### **3.3 Získávání ejakulátu volně žijících zvířat**

Existuje mnoho technik odběru spermatu. Vždy by měla být vybrána nejvhodnější technika v závislosti na fyziologii a anatomii cílového druhu s přihlédnutím k okolnostem i s ohledem na stav daného zvířete (Santiago-Moreno et al. 2013).

#### **3.3.1 Odběr ejakulátu u savců**

Uvedené techniky jsou využitelné u všech savců, oproti divoce žijícím druhům výrazně častěji však u domácích zvířat.

#### **Umělá vagína**

Sběr spermatu pomocí umělé vagíny je nejčastější technika používaná u domácích zvířat, zejména u skotu (Bhattacharya et al. 2009) a koní (Love 1992). Využívá se také u ovcí a koz (Marco-Jiménez et al. 2008; Roca et al. 1992), ale i u králíků (Amann & Foote 2004).

Umělá vagína nabízí výhodu častého vzorkování bez stresu, chemického nebo fyzikálního omezení. Způsob použití, kdy je ve většině případů potřeba asistence vyškolené osoby, vylučuje prakticky tento způsob u divokých zvířat. Odběr spermatu pomocí umělé vagíny je však možný u některých divokých druhů chovaných v zajetí, jako jsou například divocí přežvýkavci – velbloud jednohrbý (*Camelus dromedarius*) (Deen et al. 2003), los evropský (*Alces alces*), daněk evropský (*Dama dama*) nebo sob polární (*Rangifer tarandus tarandus*) (Asher et al. 2000), kozorožec iberský (*Capra pyrenaica*) a muflon evropský (*Ovis orientalis musimon*) (Santiago-Moreno et al. 2009) a další druhy, jako je slon indický (*Elephas maximus*) (Kitiyanant et al. 2000), kočka stepní (*Felis silvestris ornata*), kočka bažinná (*Felis chaus*), kočka rybářská (*Felis viverrinus*) a kočka černonohá (*Felis nigripes*) (Pope et al. 1998), Grevyho zebra (*Equus grevyi*) (Crump & Crump 1994) a primáti jako šimpanz učenlivý (*Pan troglodytes*), či orangutan bornejský (*Pongo pygmaeus*) a kosman bělovousý (*Callithrix jacchus*) (Morrell & Hodges 1998).

### **Sběr postkoitálního spermatu**

Další možností získání ejakulátu je sběr postkoitálních spermií, i když je tímto způsobem zachycena pouze část vyprodukovaného jeho celkového množství. Sperma může být odebráno přímo ze samičího reprodukčního traktu, jak bylo provedeno u nosorožců sumatránských (*Dicerorhinus sumatrensis*) (O'Brien & Roth 2000), lamy krotké a lamy alpaky (*Lama glama*, *Vicugna pacos*) (Adams et al. 2009), u šimpanzů (Morrell & Hodges 1998) a u slona indického (*Elephas maximus*) (Landowski & Gill 1964). Může být také sbíráno pomocí vaginálního kondomu, což bylo uskutečněno u lam (Bravo et al. 2000).

### **Elektroejakulace**

Elektroejakulace se při současném použití anestezie stala standardní sběrnou technikou u naprosté většiny divoce žijících savčích druhů. Nutnost navození anestezie při elektroejakulaci zvyšuje riziko negativního vlivu na zdravotní stav odebíraného jedince (Durrant 2001). Při elektroejakulaci je několik omezujících faktorů: např. hodnota napětí a počet stimulací potřebných pro erekci a ejakulaci (Durrant 1990). Některé trankvilizéry a anestetika jsou při elektroejakulaci kontraindikovány (Santiago-Moreno et al. 2013), a rovněž jejich dávkování je z fyziologického hlediska a účinku stresu druhově i individuálně odlišné. Zvíře před elektroejakulací musí být vyšetřeno tak, aby byla anestézie přizpůsobena příslušnému druhu a podle potřeby mohla být upravována i v průběhu elektroejakulace, aby nedošlo k poranění zvíře (Santiago-Moreno et al. 2011).

Elektroejakulace byla provedena u velkého počtu divokých druhů včetně nosorožců (Hermes et al. 2005), nedomestikovaných kopytníků (Abaigar 2001), medvědů (Okano et al. 2006), slonů (Howard et al. 1984), divokých kočkovitých druhů jako gepard kapský (*Acinonyx jubatus jubatus*), levhart obláčkový (*Neofelis nebulosa*), irbis (*Panthera uncia*), levhard skvrnitý (*Panthera pardus*) a puma americká (*Puma concolor*) (Howard et al. 1990 a u některých primátů jako je šimpanz, kosman či makak rhesus (*Macaca mulatta*) (Morrell & Hodges, 1998).

### **Transrektální masáž**

Zajímavou alternativou pro neinvazivní odběr spermatu je použití rektální manuální stimulace přídatných pohlavních žláz. Tato metoda byla poprvé provedena u lidí, ale i slonů (Santiago-Moreno et al. 2013) a nosorožců (Schaffer et al. 1998). Tuto techniku lze provádět častěji a na rozdíl od elektroejakulace nevyžaduje tato metoda anestézii. U nedomestikovaných

kopytníků při transrektální masáži lze navíc použít ultrazvukem řízenou stimulaci přídatných pohlavních žláz (Santiago-Moreno et al. 2013). Ejakuláty mohou být také získané stimulací z perineální oblasti, což bylo provedeno například u delfína skákavého (*Tursiops truncatus*) (Robeck & O'Brien 2004).

### **Alternativní techniky**

Některé další alternativní techniky mohou zahrnovat odběr spermií pomocí katetrizace z močové trubice, ale pouze při použití anestetik. To bylo popsáno u kočky domácí (*Felis silvestris*) (Zambelli et al. 2008). Dále se využívá stimulace penisu (u některých druhů kaloňů) (Melville et al., 2015).

### **Odběr spermatu post mortem nebo po kastraci**

Mezi invazivní metody odběru ejakulátu je řazen odběr spermatu post mortem nebo po kastraci. Pro získání kvalitních spermií je velmi nejdůležitě zkrátit čas mezi úhynem zvířete či kastrací a odběrem spermatu. Podmínkou pro přežití spermií před jejich odběrem a zpracováním je uchování kadaveru či varlat s nadvarlaty v chladu. Tkáně jsou uchovávány ve fyziologickém roztoku při teplotě 5 až 10 °C. Odebrání spermií by mělo být provedeno do 24 hodin (Quinn & White, 1967).

Odběr spermií je prováděn pomocí retrográdního vyplachování z chámovodu, které je možné provést pomocí specifických médií (Tris , kyselina citronová , glukóza) (Santiago-Moreno et al. 2009).

Spermie v nadvarleti jsou vůči kryokonzervaci poměrně citlivé. To je dáno nepřítomností semenné tekutiny. Po rozmrazení jsou méně fertillní. U některých druhů přidání semenné tekutiny k inseminační dávce úspěšnost oplodnění zvyšuje (Okazaki et al. 2012).

Odběr spermatu touto metodou byl úspěšně uskutečněn u zebry stepní (*Equus burchelli*), buvolce pestrého (*Damaliscus pygargus pygargus*), buvolce běločelého (*Damaliscus pygargus phillipsi*), buvolce modrého (*Damaliscus lunatus*), impaly (*Aepyceros melampus*), antilopy vrané (*Hyppotragus niger*), nyaly nížinné (*Tragelaphus angasii*), bahnivce horského (*Redunca fulvorufula*) a d'ábla medvědovitého (*Sarcophilus harrisi*) (Abaigar 2001).



### 3.3.2 Odběr ejakulátu u ptáků

První metodou používanou při získávání spermatu ptáků byla masážní technika kohoutů. Tato technika vyžaduje omezení pohybu ptáka přidržením jeho nohou. Masáž probíhá opakovanými rychlými pohyby po páteři směrem k ocasu, na břicho a za křídly. Kohout odpovídá erekcí kopulačního přívěsku. Odebírající jemně stiskne po stranách kloaku a provede odběr spermatu z chámovodu do sběrného kontejneru (Gee 1995).

U některých druhů je využívána manuální břišní masáž. Technika břišní masáže musí být upravena podle reprodukční anatomie druhů, u kterých je prováděna. Adaptace metody byla provedena pro vodní ptáky, běžce, hrabavé ptáky a tinamy. Všechny tyto druhy mají kopulační přívěsek podobný penisu (Birkhead et al. 2005). U ptáků, kteří produkují malé množství ejakulátu a je možné, že by došlo k jeho ztrátám, lze využít odsávací zařízení (Gee & Sexton 1990). Semeno větších druhů (čáp, jestřáb, orel) je získáváno ve stoje. U volně žijících ptáků je také často využíváno náhradní fantomové samičky. Tato metoda byla nejprve využívána sokolníky. Ptáci jsou cvičeni kopulovat na speciální zařízení, takže není potřeba se zvířaty manipulovat. Díky této technice dochází k redukci stresu, snižuje se riziko vzniku traumatu a také je nižší kontaminace ejakulátu stolicí nebo močí. Objem ejakulátu se mezi druhy i jednotlivci významně liší. U některých ptáků je kopulační chování zaznamenáno, avšak nedochází k ejakulaci nebo je produkce spermií velmi omezená až nulová (Saint Jalme et al. 1994).

### 3.3.3 Odběr ejakulátu u plazů a obojživelníků

U plazů, podobně jako u ryb, je sperma nejčastěji odebíráno využitím techniky břišní masáže. U samce se opakovaně provádí masáž v kaudální třetině břicha směrem od hlavy ke kloace. Dojde k uvolnění spermatu, které může být odebráno z kloaky injekční stříkačkou (bez jehly). Pro relaxaci kloaky, a tak usnadnění odběru, je možné použít lokální anestetika (např. 1 % lidokain) (Zacariotti et al. 2007). U hadů, ještěrek a dalších malých plazů se používá břišní masáž (Molinia et al. 2010), u větších plazů (například u želv), je možné využít elektroejakulaci (Kawazu et al. 2014).

U obojživelníků jsou spermie získávány po usmrcení samce, kdy jsou odebrána varlata k dalšímu zpracování. Ta jsou macerována v pufovaném fyziologickém roztoku, aby došlo k uvolnění spermií. Problémem je využití této techniky v případě ohrožených druhů (Browne 2002). Například u mloků se spermie při páření uvolňují do vody, ze které jsou odebrány (Figiel 2013).

Pro podporu tvorby spermií je možné alternativně samci podat lidský choriogonadotropin (hCG) (Mansour et al. 2011). Další metodou založenou na hormonálně vyvolané tvorbě spermií u obojživelníků je podávání analogu hormonu uvolňujícího luteinizační hormon LH (Sundararaj 1966).

Spermie mohou být získávány v relativně velkém množství z moče (Shishova et al. 2011).

### **3.3.4 Odběr ejakulátu u ryb**

Vzhledem ke komercializaci chovu ryb byly vyvinuty techniky umělé reprodukce ryb. Základem je umělý výtěr, kdy se získávají samičí vajíčka jikry a samčí spermie – mlíčí. Techniky, které umožňují získat mlíčí samců, jsou většinou druhově specifické. Rybí samec může být uveden do spánku či usmrcen. U živého jedince se mírným tlakem působí na břišní krajinu směrem kaudálním, dojde tak k uvolnění spermatu. Je nutné postupovat opatrně, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku vodou, krví, močí nebo stolicí (Graybill 1968). Pokud je samec usmrcen, jsou z jeho těla vyjmuta varlata, ze kterých je po rozřezání na části vytlačeno mlíčí (Pietro et al. 2014).

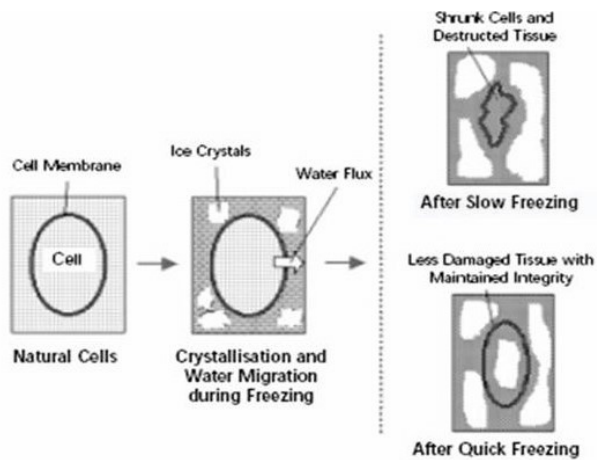
## **3.4 Metody mražení**

Kryokonzervace jako metoda zmrazení má zřejmé výhody, ale také limity pro své použití. Cílem procesu kryokonzervace je zabránit krystalizaci a dehydrataci buňky. V okamžiku, kdy se teplota blíží bodu mrazu, mohou se mimo buňku začít tvořit ledové krystaly a vytvářet tak osmotickou nerovnováhu. Tato nerovnováha způsobuje, že voda na základě osmózy opouští buňku, což vede k dehydrataci buněk. Následkem nadměrné dehydratace jsou buňky, které již nejsou schopné života. Škodlivé účinky dehydratace a krystalizace lze minimalizovat kontrolou rychlosti chlazení, používání kryoprotektivních látek, udržování vhodných skladovacích teplot a kontrolou rychlosti tání. Všechny tyto děje interagují a ovlivňují životaschopnost buněk po rozmrazení (Pratt 2017).

Dvě nejčastěji používané kryokonzervační metody pro zvířecí zárodečné buňky jsou pomalé zmrazování a vitrifikace. Jedná se o zcela odlišné metody, ale využívající stejné fyzikálně-chemické vztahy.

## Pomalé zmrazení

Při pomalém zmrazování jsou buňky v médiu ochlazený pod bod mrazu. V určité fázi se



Obrázek 1 Zdroj:

<https://discoverfoodtech.com/difference-between-fast-freezing-and-slow-freezing/>  
(accessed January 11,2020)

vytvoří hmota ledu z čisté krystalické vody. Mezi rostoucí masou ledu zůstává část frakce nezmražená, ve které jsou stlačeny všechny buňky a všechny rozpuštěné látky (viz obrázek 1). Koncentrace cukrů, solí a kryoprotektantu (např. glycerolu) se zvyšují, zatímco objem nezmražené frakce klesá. Zvýšení osmotické síly způsobuje odtok vody z

buněk. Pomalé chlazení umožňuje dostatečný odtok vody a minimalizuje možnost tvorby intracelulárního ledu.

S postupujícím ochlazováním viskozita

nezmražené frakce se stává již příliš vysokou pro jakoukoli další krystalizaci. Zbývající nezmražená frakce se tedy změní na amorfní pevnou látku, která neobsahuje žádné ledové krystaly (Karth 1990).

Prvním problémem v kryokonzervaci buněk homeotermických (teplokrevných) zvířat je v chlazení buněk pod tělesnou teplotou. Buňky mohou být poškozeny velmi rychlým ochlazením (tepelný šok) nebo mohou být poškozeny nízkou teplotou jako takovou (poškození chladem). Chování a funkce membránových lipidů a proteinů lze teplotou ovlivňovat. Například membránové lipidy, které jsou normálně v tekutém krystalickém stavu, mohou ztuhnout při nefyziologické teplotě, které může změnit jejich funkci a zahájit procesy, jako je kryokapacitace (produkce reaktivních druhů kyslíku, které zvyšují poškození membrán). Snížení teploty může způsobit nerovnováhu v buněčných procesech, protože rychlost jednoho procesu může teplota ovlivňovat více než druhého (FAO 2012).

Při metodách pomalého zmrazování jsou buňky vloženy do vhodného mrazicího média a chlazeny. Tvorba ledu nemusí nutně začít při dosažení bodu mrazu. Malé ledové krystaly mají nižší teplotu mrznutí na základě velkého povrchového napětí. Spontánní tvorba ledu se ve většině případů objevuje, pokud je roztok zchlazený na teplotu mezi -5 až -15 °C. To znamená, že buňky podstupující kryokonzervaci musí odolat řadě velkých a náhlých teplotních změn. V nezmražené frakci buňky čelí velmi vysoké koncentraci rozpuštěných látek. Dehydratace a vysoká koncentrace solí mohou vést ke ztrátě stability v membránách nebo denaturaci proteinů (Crowe

& Crowe, 1984). Navíc vysoké koncentrace solí mohou způsobit vstup extracelulárních solí do buňky (Griffiths 1979). Následkem překotného odtoku vody je rychlý pokles objemu buněk na přibližně 50 % jejich původního objemu. To vede ke strukturální deformaci buněk. Další mechanické namáhání může být způsobeno uzavřením buněk ve velmi úzkých kanálech nezmrzlého roztoku a stlačením mezi rostoucí masou ledu (Rapatz & Luyet 1960; Pegg 2007).

Obecným zkoumáním kryokonzervace buněk a dalších biologických systémů bylo zjištěno, že každý systém má specifickou optimální rychlost chlazení, se sníženým přežíváním při příliš nízké rychlosti chlazení (poškození pomalým chlazením) nebo při příliš vysoké rychlosti (poškození rychlým chlazením) (Mazur et al. 1972).

Růst ledu je rychlý proces, ale transport vody přes buněčnou membránu probíhá relativně pomalu, protože membrána působí jako odporová bariéra. Postupem ochlazování pokračuje extracelulární růst ledu a voda z nezmrzlé frakce zůstává blízko rovnováže s rostoucím ledem. Intracelulární voda má v tomto okamžiku příliš vysoký chemický potenciál, aby byla v termodynamické rovnováze, může existovat riziko intracelulární tvorby ledu. Optimální rychlost mrazení nesmí být příliš pomalá, ale ani příliš rychlá. Optimální rychlost chlazení buněk je do značné míry určena jejich objemem a plochou jejich membránového povrchu (poměr objemu k povrchu) a permeabilitou membrány do vody a na kryoprotektivní látku.

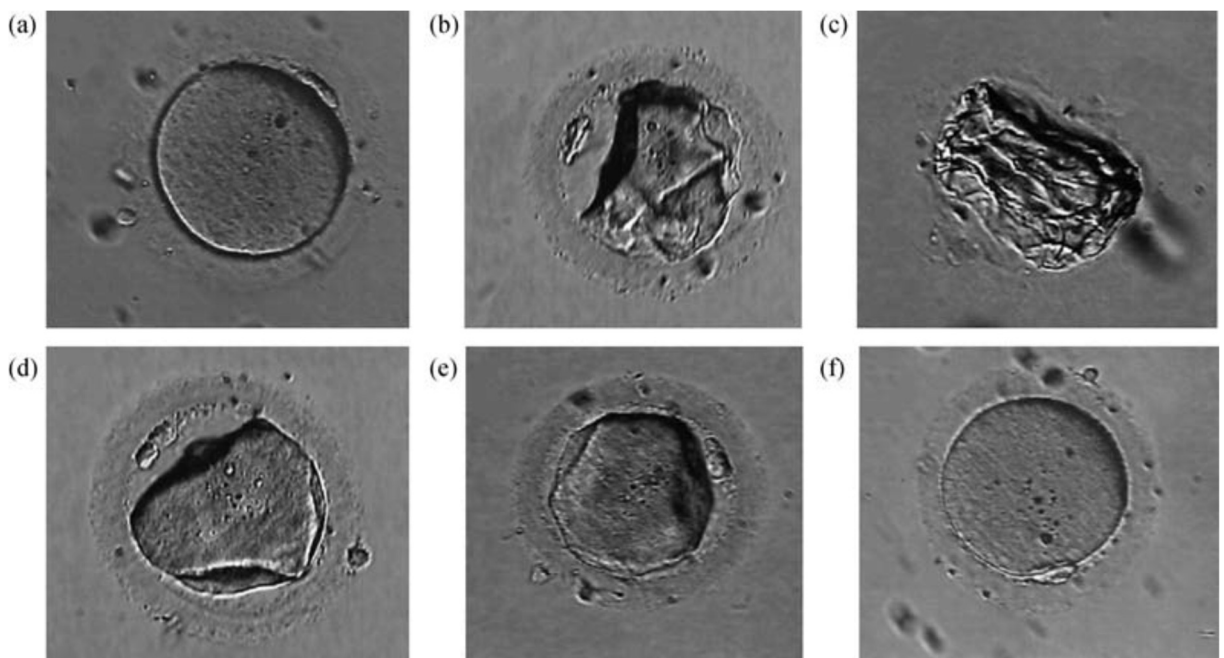
Tabulka 1: Jednoduchý postup kryokonzervace

etapa	postup	metody/obecné vybavení			
Příprava vzorků	Kolekce				
	Frakce	odstředění			
	Skladovací nádoby	skleněné ampule	brčka	sáčky	zkumavky s uzávěrem
	Zmazení	řízené zmrazení	rychlé zmrazení	kryoprotektanty	vitifikace
Kryokonzervace	Označení	označování lahvíček	vedení záznamů		
	Úložný prostor	úložné boxy, stojany	mrazák	LN2 skladovací nádoby	
Regenerace buněk/využití	Načtení	vyhledávání	vedení záznamů		
	Doprava	LN2	izolační kontejnery		
	Rozmrazení	vodní lázeň			
	Analýza nebo růst	růstové médium			

Zdroj: <https://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/cryopreservation-freezing-methods-and-equipment-292855> (accessed January 11,2020)

## Vitrifikace

Jako vitrifikace se označuje jakýkoli proces vedoucí k přeměně z kapaliny na pevnou látku bez krystalizace. Vitrifikační metody zahrnují použití média, které má na začátku velmi vysokou hodnotu koncentrace rozpuštěných solí. Led se tedy nemůže tvořit v žádné části vzorku. Vitrifikovaný stav a související fyzikálně-chemické podmínky získané použitím vitrifikační metody jsou do jisté míry podobné metodám získaným pomalým ochlazováním, ale způsob, jak dosáhnout tohoto bodu, je zcela odlišný. Stejně jako v případě pomalého zmrazení mohou vitrifikační metody poškodit buňky nebo tkáně šokem z chladu nebo způsobit jejich poškození. V závislosti na použitém materiálu a použitém protokolu však mohou být buňky nebo tkáně rychle ochlazeny a zdá se, že extrémně vysoká rychlost chlazení do vitrifikovaného stavu může „předběhnout“ šok z chladu a poškození chladem. Při vitrifikaci jsou buňky nebo tkáně vpraveny do média, které má velmi vysokou koncentraci kryoprotektivních činidel a pokud je koncentrace dostatečně vysoká, vitrifikační roztoky ztuhnou bez jakéhokoli rizika tvorby intracelulárního nebo extracelulárního ledu během chlazení nebo zahřívání, nezávisle na použité rychlosti. Velmi vysoké koncentrace kryoprotektivního činidla mohou způsobit poškození v důsledku náhlých osmotických změn, extrémně nízkého vodního potenciálu nebo díky chemické toxicitě (Rall 1987).



Obrázek 2. Morfologické změny lidských oocytů MII ve vitrifikačním roztoku, a) před vitrifikací; b) v rovnovážném roztoku c) ve vitrifikačním roztoku; d) v ředícím roztoku; e) v promývacím roztoku; (f) v kultivačním médiu 5 minut po posledním promytí (Huang et al. 2019).

## Vymrazování (lyofilizace)

Skladování lyofilizovaného biologického materiálu je mimořádně nákladově efektivní, protože není drahé, a navíc je spolehlivé. Materiál může být skladován při běžných teplotách a na rozdíl od kryogenního skladování nehrozí žádné riziko závady na zařízení nebo zranění osob tekutým dusíkem. Obecně lyofilizace snižuje životaschopnost buněk. Prvním krokem při přípravě lyofilizovaného materiálu je nutnost přivést biologický materiál do vitrifikovaného stavu. Dalším krokem je použití vakua, které zajistí sublimaci přítomného ledu, a snížení obsahu vody u vitrifikovaného materiálu. Tím se zvyšuje teplota přechodu do lyofilizovaného stavu, která nakonec dosáhne úrovně vyšší, než je okolní teplota. Na konci tohoto procesu může být materiál skladován při okolní teplotě, přičemž zůstává ve stabilním stavu. Je zřejmé, že počáteční postup, kterým je vitrifikace a použité médium, by měl být optimalizován tak, aby zajistil v této fázi přežití biologického materiálu. Kromě toho musí být složení média optimalizováno tak, aby se zabránilo poškození buněk díky účinku další dehydratace materiálu (FAO 2012).

## 3.5 Kryoprotektiva

Kryoprotektanty jsou chemikálie, které zabraňují poškození buněk mrazem; jejich použití v kryoprotektivních médiích je nedílnou součástí udržení životaschopnosti spermií během procesu zmrazení (Gilmore et al. 1990). Mezi nejpoužívanější kryoprotektanty patří ethylenglykol (EG), propylenglykol (PG; 1,2-propandiol), dimethylsulfoxid (DMSO), glycerol (GLY), formamid (FMD), methanol (METH) a butandiol (BD; 2,3-butandiol). Nejčastěji se používá glycerol, propylenglykol a dimethylsulfoxid.

Kryoprotektivní roztok může být mrazivý roztok nebo může být roztokem nosiče. Takový roztok umožňuje buňkám snadnější přežívání při nízkých teplotách. Roztok nosiče často obsahuje nutriční soli, pufrů, osmogeny a inhibitory apoptózy, udržuje tak izotonickou koncentraci (300 milimolů), takže buňky v nosičích ani neobtnají, ani se nesmršťují. Během procesu zmrazování zůstává koncentrace roztoku nosiče vždy konstantní. Stejně jako nosné kryoprotektanty existuje i další typ kryoprotektantů nazývaný pronikající kryoprotektanty. Základní úlohou penetračních kryoprotektantů je snížení dehydratace buněk a umožnění růstu ledu. Penetrační kryoprotektanty jsou hlavními složkami vitrifikačních roztoků. Existují i látky, které zůstávají vně buněk, nepronikající kryoprotektanty. Většinou jsou to makromolekulární polymery jako např. polyvinylpyrrolidon (PVP) a polyethylenglykol (PEG). Tyto látky jako součásti kryoprotektivních roztoků inhibují růst ledu pomocí stejného mechanismu jako u

penetračních kryoprotektantů. Tyto kryoprotektanty jsou ve srovnání s penetračními kryoprotektanty ve stejné koncentraci vysoce toxické. Roztoky kryoprotektantů (vitrifikační roztoky) také obsahují složky, které se nazývají blokátory ledu a přímo pomáhají blokovat jeho růst. Příkladem je polyglycerol, polyvinylalkohol, X-1000 a Z-1000 (Bhattacharya 2018).

Pro působení kryoprotektantů je důležitá membránová permeabilita. Působení neelektrolytů na membránovou permeabilitu bylo studováno na řadě typů buněk, včetně lidských krevních buněk. Faktor určující permeabilitu membrány je rozpustnost látky v tucích a vodíková vazba, která snižuje propustnost. Obecně se permeabilita snižuje se zvyšující se molekulovou velikostí látky. Na rozdíl od lidských krevních buněk, které jsou pro dimetylsulfoxid asi dvakrát tak propustné než pro glycerol, jsou lidské spermie pro glycerol téměř třikrát propustnější než pro dimetylsulfoxid (Gilmore et al. 1991). Pro lidské červené krvinky a spermie je propustnost pro ethylenglykol velmi vysoká ve srovnání s ostatními běžně používanými kryoprotektanty. Pro lidské oocyty má nejvyšší permeabilitu propylenglykol jako nejčastěji používané kryoprotektivum, nejnižší permeabilitu má ethylenglykol (Van den Abbeel 2007). Pro různé typy buněk má dimetylsulfoxid mnohokrát vyšší membránovou permeabilitu než glycerol (Yu & Quinn 1994).

### 3.5.1 Toxicita kryoprotektiv

Díky vysokým koncentracím kryoprotektiv lze usměrňovat tvorbu ledu během kryokonzervace buněk, tkání a orgánů na kryogenní teploty. S rostoucí koncentrací těchto látek se zvyšuje jejich toxicita. Toxicita kryoprotektiv byla popsána jako hlavní překážka kryokonzervace vitrifikací. Bylo vyzkoušeno mnoho způsobů, které se snažily o překonání problému eliminace ledu při mrazení a zároveň minimalizovaly toxicitu kryoprotektiva, například šlo o optimalizaci rychlosti chlazení a zahřívání, nebo pokusy optimalizování doby přidávání kryoprotektiva v průběhu chlazení (Fahy 1986). Způsoby a látky používané v současnosti v kryokonzervaci zatím nedokážou potlačit toxicitu využívaných kryoprotektiv, což je největší překážkou kryokonzervace (Fahy et al. 1987).

Toxicita kryoprotektiv je specifická a nespecifická. Specifická toxicita se váže ke konkrétní chemikálii a jedná se o účinky především při vysokých teplotách, v určitých buňkách či orgánech (Fahy et al. 2004). Nespecifickou toxicitu způsobují kryoprotektiva používaná při kryokonzervaci, kdy dochází k narušování vodíkových vazeb mezi molekulami vody, aby bylo zabráněno tvorbě ledu. Znalosti účinků a mechanismů specifické toxicity jsou velmi důležitým momentem pro volbu vhodných látek jako kryoprotektantů (Towey & Dougan 2012).

Všechny buňky, tkáně a organismy jsou složeny ze stejných či podobných buněčných složek a makromolekul. Abbazari et al. (2013) uvádí, že prakticky všichni vědci zabývající se kryokonzervací se shodují, že toxicitu kryoprotektiv nelze stanovit jednotně pro všechny buňky, tkáně či organismy, protože se projevuje různě. Uvádí tedy, že porozumění důvodům rozdílné toxicity v různých biologických prostředích může vést k pochopení mechanismů toxicity kryoprotektiv (Abbazari et al. 2013). Rozdíly projevující se ve výsledcích výzkumů toxicity kryoprotektiv mohou vznikat i díky tomu, že podmínky při experimentech nejsou stejné. Často se při experimentech uvádí odlišná teplota, různá bývá také koncentrace užitého kryoprotektiva, doba expozice kryoprotektiva, roztok nosiče kryoprotektiva, ale odlišně jsou prováděny i testy toxicity (test životaschopnosti). Toxicita kryoprotektiv se projevuje narušením nebo poškozením buněčné membrány, narušením funkcí enzymů, redukcí vývoje buněk či embryí, narušením pohyblivosti spermií, snížením funkce mitochondrií, nebo poškozením DNA proteinu či jiných makromolekul. Některé účinky, které jsou považovány za důsledek toxicity kryoprotektiv, mohou být ve skutečnosti způsobeny například osmotickým šokem, či oxidačním stresem (Fahy et al. 1990).

Nadměrný osmotický stres může narušit strukturu bílkovin a snížit aktivitu enzymů, způsobit poškození DNA a apoptotickou buněčnou smrt (Christopf 2007).

### 3.6 Poškození kryokonzervací

Jevy, které mohou způsobit poškození buněk během kryokonzervace, se vyskytují hlavně během fáze zmrazení a projevují se účinky na roztok, tvorbou extracelulárního ledu, dehydratací a tvorbou intracelulárního ledu.

Při kryokonzervaci často dochází k osmotickému poškození, studenému šoku a poškození chladem. Poškození biologického materiálu tímto způsobem nelze přičítat toxicitě kryokonzervantů, ale často se toto poškození za toxicitu zaměňuje, protože kryoprotektiva s nízkou propustností mohou způsobit více osmotického stresu než kryoprotektiva s vysokou propustností (Naccache & Sha'afi 1973). Například lidské oocyty mají pro etylenglykol asi o polovinu nižší permeabilitu ve srovnání s propylenglykolem a dimetylsulfoxidem. Při použití etylenglykolu je zvýšená možnost poškození membrány osmotickým stresem, ale etylenglykol je výhodný kryoprotektant, protože je méně toxický. Zvolit nejvhodnější kryoprotektant není jednoduché (Mullen 2004). U oocytů prasat vedla kryokonzervace s propylenglykolem k vyššímu přežití než s etylenglykolem díky větší propustnosti (a menšímu poškození osmotické membrány), ale vývojová kompetence oocytů, které přežily kryokonzervaci, byla větší při použití etylenglykolu, což naznačuje, že propylenglykol je toxičtější (Somfai et al. 2013).



Lidské spermie konzervované v 1M etylenglykolu vykazovaly více životaschopnosti než spermie kryokonzervované v 1 M glycerolu, protože etylenglykol je čtyřikrát více propustný pro membránu, a tedy způsobuje menší osmotické poškození. Použití 2 M etylenglykolu nevedlo k lepší motilitě než 1 M glycerolu, což může dokládat toxicitu etylenglykolu (Gilmor et al. 1997).

Poškození v důsledku chladu znamená poškození vyvolané v buňkách udržovaných při kritických teplotách, které jsou nižší než ty, při kterých buňky normálně fungují. Studený šok se týká snížené životaschopnosti buněk, která je způsobena buď rychlým nebo významným poklesem teploty. Účinek studeného šoku a poškození chladem na buněčné organely, zejména v buněčných membránách, se překrývá (Weber & Marahiel 2002).

### 3.7 Kryokonzervace gamet

Mnoho živočišných druhů je na pokraji vyhuby, nebo je silně ohroženo. U ohrožených druhů chovaných v zajetí je snaha o zachování biologické rozmanitosti. Proto jsou metody, které umožňují uchovávat genetický materiál, jenž umožňuje jejich reprodukci, jako je kryokonzervace, stále více využívány. Kryokonzervace se v současnosti používá s rostoucí četností a vytvářejí se tak „banky genomových zdrojů“ nebo „zmrazené zoologické zahrady“. Rozhodujícími body při kryokonzervaci je stanovení standardů spermií a citlivost spermií na zmrazení. Protokoly, které vznikly na základě používání při kryokonzervaci gamet a embryí domácích nebo neohrožených druhů, byly uzpůsobeny pro divoké a ohrožené druhy zvířat. Tyto reprodukční technologie jsou obvykle druhově specifické a u mnohých divokých druhů neefektivní. Jako primární buněčný typ v genových bankách figurují zejména spermie, a to díky své snadnější dostupnosti v dostatečném počtu buněk ve srovnání s oocyty a embryi. Míra úspěšnosti reprodukce živých mláďat z kryokonzervovaných gamet nebo embryí je velmi odlišná. Značné rozdíly lze nalézt jak u jednotlivců, tak u druhů zvířat. Existuje předpoklad, že odlišnosti mezi základními charakteristikami gamet mohou ovlivnit účinnost kryokonzervace a následně tak schopnost narození živých mláďat. Příčinou nízké úspěšnosti zabřeznutí nemusí být pouze neúčinná kryokonzervace. Omezujícím faktorem může být spíše nedostatek informací a znalostí o reprodukční biologii některých druhů. U některých druhů je prokazatelný vliv ročního období na úroveň spermatogeneze. Vliv sezónnosti se může projevit velmi odlišně, například téměř úplným zastavením spermatogeneze spojeným s recesí varlat (Sipek et al. 2019; Liebo & Songsasen, 2002).

V případě volně žijící zvěře existuje mnoho druhově specifických charakteristik spermií. Mezidruhově se liší i objem ejakulátu a jeho koncentrace. Velkoobjemové ejakuláty přesahující

100 ml koncentrovaného spermatu lze odebrat od slonů, kanců nebo oslů, malý objem v řádu mikrolitrů mají například zástupci rodu *Ryposovitých* (Saragusty et al. 2009). Odlišná je i koncentrace spermií v ejakulátu. V závislosti na druhu se spermie liší velikostí i tvarem, což může být následek adaptace na konkurenci spermií nebo faktory prostředí. Například spermie většiny amerických vačnatců tvoří během svého zrání páry (Moore et Taggart, 1995). Toto párování změní dvě spermatozoa na biflagelární jednotku, pravděpodobně se zlepšenými schopnostmi pohybu, což zvýší úspěšnost oplození vajíčka (Moore & Taggart 1995).

Kryokonzervace konvenčního spermatu je v současnosti již běžnou praxí, kdy protokoly a kryokonzervanty jsou vyzkoušené a běžně používané. Proto se začali vědci zajímat o spermie, které by byly extrahovány přímo z nadvarlete. Spermie získané z ocasu nadvarlete mají některé zvláštnosti, jako je absence semenné plazmy a velké množství distálních cytoplazmatických kapiček, které vyžadují speciální manipulace, jak při kryokonzervaci, tak při oplodnění (Briz et al. 1995).

Semeno představuje spojení spermatu se semennou plazmou, která je vylučovaná samčími přídatnými pohlavními žlázami.

Ve varlatech dochází ke spermiogenezi, poté nedozrálé spermie přecházejí do nadvarlete, kde nastává dozrávání a shromažďování zralých spermií. Nadvarle poskytuje příznivé prostředí pro udržení spermatu s fertilizační schopností po dobu několika týdnů (Tittarelli et al. 2006).

Kryokonzervace spermatu zahrnuje několik po sobě jdoucích kroků. V případě volně žijících zvířat je jedním z nejproblematictějších kroků samotný odběr spermatu. Následuje vyšetření spermatu, ošetření spermatu kryoprotektivy, jeho chlazení, zmrazení, uchování a rozmrazení. Při všech těchto krocích může dojít k poškození spermií. Základem metod vedoucích k prodloužení přežívání spermií je snížení teploty semene, které vede ke snížení metabolické aktivity spermií (Holt et al. 2005). Pro další uchování spermií je nutné spermie zmrazit. Proces kryokonzervace spermií však zahrnuje sérii fyzikálních a chemických změn, které mohou v konečném důsledku buňku poškodit (Thurston et al. 2002).

Důležitým krokem je vyšetření ejakulátu. Jsou hodnoceny základní ukazatele kvality: objem ejakulátu, koncentrace spermií, celkové množství spermií v ejakulátu, morfologie, motilita a viabilita spermií (Gadea et al. 2004).

Po tomto základním vyšetření nastává samotná kryokonzervace. Při zmrazování spermií se ke zvýšení procenta viabilních spermií používají kromě kryoprotektantů i extendery, což jsou roztoky, obsahující většinou extracelulární látky. Potřebné je druhově specifické přizpůsobení prodlužovačů zmrazování, aby byly spermie ochráněny proti škodám, které jsou způsobeny chlazením, zmrazením a následnými rozmrazovacími procesy. Proto musí být použitý pro

každý druh adekvátní extender (Curry 2000; Thurston et al. 2002). Způsob a míra kryokonzervace úzce souvisí s fyziologií spermií a druhu, protože rozdíly se objevují i mezi blízkými příbuznými druhy nebo dokonce jedinci stejného druhu. (Thurston et al. 2002). Například spermie slona indického jsou citlivější na chlazení než spermie slona afrického (Swain & Miller, 2000). Při výběru typu kryoprotektivního roztoku jsou důležité informace o koncentraci vaječného žloutku (nebo jeho náhrad), glycerolu, přítomnost cukrů, antibiotik, pufrů a dalších přísad (Loskutoff et al. 1996; Fernández-Santos et al. 2007).

Glycerol je považován za nejúčinnější kryoprotektivum pro spermie velké většiny savců. Citlivost na tento kryoprotektant je druhově odlišná. Například při zpracování ejakulátu u vačnatců lze použít vysoké koncentrace glycerolu > 14 % (Keeley et al. 2012), spermie jiných druhů zvířat (prase, myš) jsou na glycerol citlivější (Koshimoto et al. 2000). Také u ptáků je glycerol obvykle považován za vhodný kryoprotektant, ale ne vždy. U některých druhů má antikoncepční účinek (Hammerstedt & Graham, 1992). Zdá se, že dimethylacetamid tyto antikoncepční účinky nemá a byla s ním dosažena dobrá kvalita u zmrazených spermií, tak i míra plodnosti u krůt a jeřába kanadského (Blanco et al. 2012). U ryb, obojživelníků a plazů byl do glycerolu přidáván methanol, dimethylsulfoxid, ethylenglykol nebo dimethylformamid v koncentracích v rozmezí 2 až 25 % (Millar & Watson 2001; Johnston et al. 2014).

Pro kryokonzervaci spermií se používají tři hlavní metody, a to velmi pomalé zmrazení, pomalé zmrazení a vitrifikace. Nejrozšířenější je technika pomalého zmrazení. Technika velmi pomalého zmrazování spočívá v postupném ochlazování spermií po dobu delší než 4 hodiny. Tímto způsobem se provádí zmrazení tak, že se nejprve pomalu sníží teplota spermatu v lednici na 5 °C a poté se vzorek umístí do kryoboxu a ochladí se na – 80 °C během 2 až 4 hodin. vzorek je pak uchováván v tekutém dusíku (Thachil & Jewett 1981). Optimální rychlost chlazení je určena druhově. Při použití techniky pomalého mrazení má intracelulární voda na opuštění buněk dostatek času, což udržuje osmotickou rovnováhu a zabraňuje riziku tvorby intracelulárního ledu. Technika je obdobná jako při velmi pomalém zmrazování. Vzorek je suspendovaný společně s mrazícím extenderem a je nejprve pomalu ochlazen na asi 5 °C a poté zmrazen během několika minut na požadovanou teplotu (v rozmezí asi - 30 až pod - 100 °C v závislosti na protokolu), následně je ponořen do tekutého dusíku a připraven ke skladování. V současnosti se využívají dvě metody. První je vyrovnané mrazení v parách tekutého dusíku a druhé je směrové mrazení. Uvnitř par dusíku je teplotní gradient v závislosti na vzdálenosti od povrchu hladiny tekutého dusíku a jeho objemu. Při mrazení párami tekutého dusíku se vzorky umístí buď vodorovně na předdefinovanou vzdálenost nad povrch tekutého dusíku pro dosažení požadované rychlosti chlazení, nebo jsou umístěny uvnitř programovatelného

mrazícího zařízení s řízenou rychlostí mrazení. Vzdálenost od povrchu kapalného dusíku a doba trvání expozice závisí opět na druhu mrazených spermií. Používají se mrazničky s regulovanou rychlostí, kde je destička pro uchovávání vzorků chlazená tekutým dusíkem. Po dokončení procesu zmrazení se vzorky vyjmou a uloží do kapalného dusíku. Technika směrového zmrazování (Arav et al. 2000) se spoléhá na řízený pokles teploty vzorku k předdefinovanému teplotnímu gradientu. To umožňuje přesnou kontrolu rozptylu tepla a šíření ledových krystalů, morfologie a rychlosti během procesu zmrazování. Směrové zmrazení se používá pro kryokonzervaci spermií široké škály druhů (Arav & Saragusty 2013). Tato technika je vhodná pro zmrazování vzorků v objemech od standardních 0,25 ml po 12 ml. Směrové zmrazení se také používá u vitrifikaci oocytů a embryí (Rubinsky, 1992). Aby bylo dosaženo vitrifikace, musí nastat rovnováha mezi viskozitou vzorku, objemem a rychlostí chlazení (Endo et al. 2012).

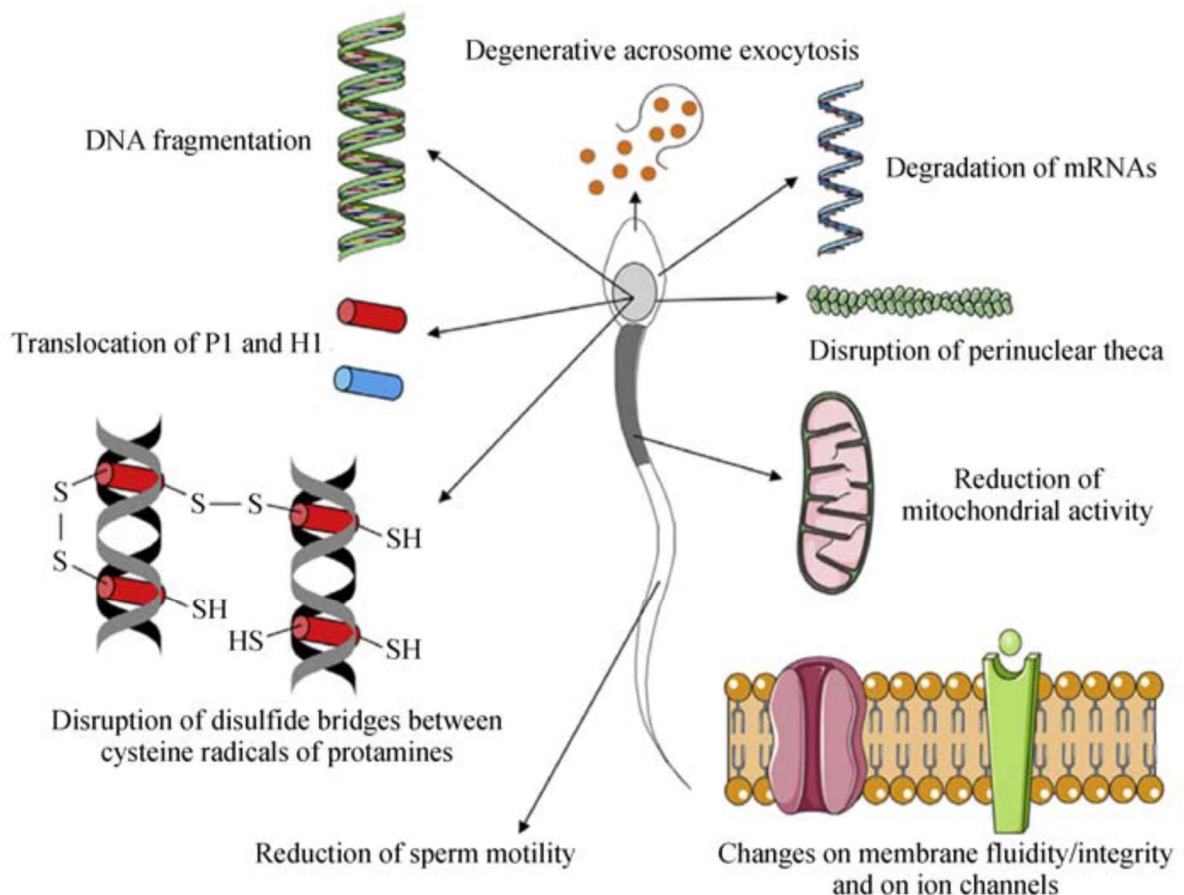
K poškození spermií vlivem kryokonzervace je náchylná především plazmatická membrána spermií. Avšak i při použití vyhovujících kryokonzervačních technik dochází u řady savčích druhů k poškození plazmatické membrány zhruba u 50 % spermií. Poškození plazmatické membrány může být způsobeno neschopností spermií dostatečně přizpůsobit svůj objem osmotickým změnám vznikajícím při formování a rozpouštění ledových krystalů. Hlavními činiteli poškozujícími spermie v průběhu zmrazování a rozmrazování spermatu jsou osmotický stres, chlad, mráz a oxidační stres (Grossfeld et al. 2008).

Osmotický stres vzniká během kryokonzervace spermií působením permeabilních kryoprotektiv v isotonickém médiu a zmrznutím extracelulární vody, což vede ke zvýšení osmolarity média (Johnston et al. 2006). Díky tomu dochází k výměně vody a iontů mezi buňkou a médiem (Caiza de la Cueva et al. 1997). Při rozmrazování spermií pak změny probíhají opačně. Celý proces výměny vody a iontů mezi spermií a médiem má danou časovou posloupnost. Omezení osmotického stresu by bylo možné, pokud by došlo k rychlejšímu zmrazování spermií, ovšem tím by došlo ke zvýšení nežádoucí tvorby ledových krystalů uvnitř buňky. Proto je potřeba najít vyvážený vztah mezi koncentrací kryoprotektiv a rychlostí mrazení (Hammadeh et al. 2001).

V průběhu procesu chlazení mohou některé spermie prodělat změny, které jsou podobné změnám nastávajícím při kapacitaci. Tyto změny se souhrnně nazývají kryokapacitací a snižují funkční kvalitu a délku života spermií (Bailey et al. 2008). Míra poškození spermií chladem závisí jak na rychlosti, kterou jsou spermie zchlazeny, tak i na finální teplotě, na kterou se zchladí. Poškození chladem lze redukovat přidávkou například glycerolu do mrazícího kryoprotektantu. Náchylnost spermií k poškození mrazem se liší mezi druhy i jedinci (Holt et al. 2005). Je možné, že by šlo stanovit rychlost kryokonzervace pro konkrétní zvíře, protože

pokud je chlazení příliš rychlé, voda nestihne ze spermií proniknout do okolního média a dojde k tvorbě intracelulárních ledových krystalků. Pokud je rychlost chlazení příliš pomalá, intracelulární krystaly sice nezačnou vznikat, ale dojde ke zvýšení koncentrace rozpuštěných látek uvnitř buňky. Změna v nitrobuněčném pH a změna v iontovém složení může vést k narušení plazmatické membrány nebo až k denaturaci DNA spermie. Problémem je, že nelze plně kontrolovat kolísání teploty ve vzorku během kryokonzervace, a tak dochází k narušení optimálního průběhu mrazicí křivky. U některých programovatelných zmrazovačů lze částečně rychlost mrazení kontrolovat a díky tomu vyvozovat, kdy dochází k tvoření krystalů (Thurston et al. 2002).

Významné je také poškození spermií oxidačním stresem. V průběhu procesu kryokonzervace savčích spermií dochází k produkci reaktivních metabolitů kyslíku a tím k porušení rovnováhy mezi produkcí reaktivních metabolitů kyslíku a antioxidantů (Mazur et al. 2000). Gadea et al. (2004) prokázali na myších spermiích mechanismus negativního působení reaktivních metabolitů kyslíku na spermie. Ani po přidání přirozeného antioxidantu glutathionu se životaschopnost spermií nezlepšila.



Obrázek 3 Hlavní poškození spermatu prasat způsobené zmrazováním a rozmrazováním (Yeste et al 2017).

### 3.8 Příklady kryokonzervace ejakulátu některých volně žijících zvířat

V roce 2009 byla publikována studie, která se věnovala odběru a kvalitě semene po rozmrazení volně žijících supů bělohavých (*Gyps fulvus*). Odběr spermatu a jeho kryokonzervace byly prováděny na čtyřech jedincích pocházejících z přírody i ze zajetí. Odběr spermatu byl prováděn metodou břišní masáže dvakrát týdně v období prosinec – březen. Účinnost odběru spermatu byla spíše nízká (27,9 %) a mezi jedinci se nelišila. U ejakulátu všech čtyř supů nebyly zjištěny rozdíly v objemu, koncentraci spermií ani jejich životaschopnosti. Po zmrazení a následném rozmrazení spermatu byla životaschopnost spermií oproti čerstvému ejakulátu nižší (Madeddu et al. 2009). Kryokonzervace spermatu je možností, jak zachovat genetický potenciál u vzácných druhů, mezi něž patří sup bělohavý (Madeddu et al. 2009)

Kryokonzervaci spermií u muflona evropského (*Ovis musimon*) a daňka evropského (*Dama dama*) získaných post mortem ve své práci popisuje (Bóveda et al. 2018). Byla posuzována účinnost konvenčního pomalého zmrazování s využitím glycerolu ve srovnání s ultrarychlým zmrazením se sacharózu místo glycerolu. Posuzovány byly vlastnosti spermií – motilita, viabilita, integrita akrozómu a membrán a morfologické abnormality před a po kryokonzervaci. Hlavním přínosem výzkumu bylo ověření možnosti použití metody ultrarychlého zamrazení spermií volně žijících přežvýkavců pro jednoduchost provedení a spolehlivost přímo v terénu (Bóveda et al. 2018).

## 4 Závěr

V bakalářské práci byly shrnuty důležité informace týkající se způsobů kryokonzervace ejakulátu samců. Jako důležitá součást rešerše byla zařazena část týkající se různých metod odběru ejakulátu nejen u odlišných druhů volně žijících savců, ale i u ptáků, obojživelníků, plazů a ryb.

Jako velmi zásadní se ukázala skutečnost naléhavé situace v oblasti zachování druhové rozmanitosti a početnosti populací jednotlivých druhů zvířat. Popsaná problematika ukázala možnosti použití metod kryokonzervace u volně žijících druhů zvířat, zároveň však byly odkryty i další oblasti, kterým je nutné se v tomto směru ještě v budoucnosti věnovat.

U některých vzácných zvířat reprodukce probíhá velmi pomalu a přirozený způsob rozmnožování v mnoha případech již není možný. Příkladem mohou být severní bílí nosorožci, kterých ve volné přírodě v Africe žije již jen několik posledních kusů. Proto je v současné době hlavním cílem je rozmnožit a uchovat jejich genetickou informaci.

## 5 Literatura

- Abaigar T, Cano M, Pickard AR, Holt WV. 2001. Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. *Reproduction* **122**:265-73.
- Abazari A, Jomha NM, Elliott JA, Mcgann LE. 2013. Cryopreservation of articular cartilage. *Cryobiology* **66**:201–209.
- Adams GP, Ratto MH, Collins CW, Bergfelt DR. 2009. Artificial insemination in South American camelids and wild equids. *Theriogenology* **71**:166-75.
- Amann RP, Foote RH. 2004. Artificial vagina for rabbits. *J Androl* **25**: 184–185.
- Arav A, Gacitua H, Zenou A, Malmakov N, Gootwine E, Bor A. 2000. Cryopreservation of ram semen using various freezing extenders and new freezing device. In: Baer CK (ed) *Small ruminant reproduction, Satellite of the 14th International Congress on Animal Reproduction*. Sundens, Norway.
- Arav A, Saragusty J. 2013. Directional freezing of spermatozoa and embryos. *Reprod Fertil Dev* **26**:83–90.
- Asher GW, Berg DK, Evans G. 2000. Storage of semen and artificial insemination in deer. *Animal Reproduction Science* **62**:195-211.
- Bhattacharya S. 2018. Cryoprotectants and Their Usage in Cryopreservation Process, *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*, Yusuf Bozkurt, IntechOpen. Available from <https://www.intechopen.com/books/cryopreservation-biotechnology-in-biomedical-and-biological-sciences/cryoprotectants-and-their-usage-in-cryopreservation-process> (accessed January 11, 2020).
- Bhattacharya HK, Goswami BK, Bujarbaruah KM, Deka BC, Biswas RK. 2009. Collection and characterization of semen in Mithun (*Bos frontalis*) bulls. *Theriogenology* **72**:699–703.
- Birkhead TR, Pellatt EJ, Brekke P, Yeates R, Castillo-Juarez H. 2005. Genetic effects on sperm design in the zebra finch. *Nature* **434**:383-7.
- Blanco JM, Long JA, Gee G, Wildt DE, Donoghue AM. 2012. Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: effects of freezing and thawing rates on turkey and sandhill crane sperm cryosurvival. *Anim Reprod Sci* **131**:1–8.
- Bóveda P, Estes MC, Castaño C, Toledano-Díaz A, López-Sebastián A, Muñiz A, Prieto P, Mejía O, Ungerfeld R, Santiago-Moreno J. 2018. Slow and ultra-rapid freezing protocols for cryopreserving mouflon (*Ovis musimon*) and fallow deer (*Dama dama*) epididymal sperm. *Animal Reproduction Scienc*.
- Bravo PW, Ccallo M, Garnica J. 2000. The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. *Small Ruminant Research* **38**:91-5.



- Briz MD, Bonet S, Pinart B, Egozcue J, Camps R. 1995. Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. *Journal of andrology* **16**:175-188.
- Browne RK, Davis J, Clulow J, Pomeroy M. 2002. Storage of cane toad (*Bufo marinus*) sperm for 6 days at 0 C with subsequent cryopreservation. *Reproduction, Fertility and Development* **14**: 267-73.
- Crowe JH, Crowe LM. 1984. Effect of dehydration on membranes and membrane stabilization at low water activities. In D. CHAPMAN, ed. *Biological membranes* pp:57–103. New York/London, Academic Press.
- Curry MR, Kleinhans FW, Watson, PF. 2000. Measurement of the water permeability of the membranes of boar, ram and rabbit spermatozoa using concentration-dependent self-quenching of an entrapped fluorophore. *Cryobiology* **41**:167–173.
- Crump Jr JP, Crump JW. 1994. Manual semen collection from a Grevy's zebra stallion (*Equus grevyi*), onset of sperm production, semen characteristics, and cryopreservation of semen, with a comparison to the sperm production from a Grant's Zebra stallion (*Equus burchelli boehmi*). *Theriogenology* **5**:1011-21.
- Deen A, Vyas S, Sahani MS. 2003. Semen collection, cryopreservation and artificial insemination in the dromedary camel. *Animal reproduction science* **77**:223-33.
- Devries AL. 1983. Antifreeze peptides and glycopeptides in coldwater fishes. *A. Rev. Physiol* **45**: 245–260.
- Durrant BS. 1990. Semen collection, evaluation, and cryopreservation in exotic animal species: maximizing reproductive potential. *ILAR Journal* **32**:2-10.
- Durrant BS. 2001. The importance and potential of artificial insemination in CANDES (companion animals, non-domestic, endangered species). *Theriogenology* **71**:113-22.
- Endo Y, Fujii Y, Kurotsuchi S, Motoyama H, Funahashi H. 2012. Successful delivery derived from vitrified-warmed spermatozoa from a patient with nonobstructive azoospermia. *Fertility and sterility* **98**:1423-7.
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* **21**:407-426.
- Fahy GM.1986. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology* **23**:1–13.
- Fahy GM, Levy DI, Ali SE.1987. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. *Cryobiology* **24**:196–213.
- Fahy GM, Wowk B, Wu J, Paynter S. 2004. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology* **48**:22–35.
- Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MS, Meryman HT.1990. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms. *Cryobiology* **27**:247–268.

Fahy GM, Wowk B. 2007. Cryopreservation of Complex Systems: Slow Freezing Has Not Had Its Day Yet. *Rejuvenation Research* **10**:103-106.

FAO Roma. 2012. Cryoconservation of animal genetic resources FAO Roma 203.

Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, García-Macías V, Estes M, Soler AJ, de Paz P, Anel L, Garde JJ. 2007. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian Red deer epididymal spermatozoa. *Theriogenology* **67**:738–753.

Figiel CR. 2013. Cryopreservation of sperm from the axolotl *Ambystoma mexicanum*: implications for conservation. *Herpetol. Conserv. Biol* **8**:748-755.

Fuller B. 2003. Dip into History: Science and Publication in Cryobiology 150 Years ago. *Cryo Letters* **3**:133 – 134.

Gee GF. 1995. Artificial insemination and cryopreservation of semen from nondomestic birds.

Gee GF, Sexton TJ. 1990. Cryogenic preservation of semen from the Aleutian Canada goose (*Branta canadensis leucopareia*). *Zoo biology* **9**:361-71.

Gilmore JA, Liu J, Gao DY, Critser J. 1997. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Human reproduction* **12**:112-8. Oxford, England.

Graybill JR .1968. Cryo-preservation of viable fish sperm.

Griffiths JB, Cox CS, Beadle DJ, Hunt CJ. Reid, D.S. 1979. Changes in cell size during the cooling, warming and post-thawing periods of the freeze-thaw cycle. *Cryobiology* **16**: 141–151.

Grossfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell WM, Rath D. 2008. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* **70**:1225-33.

Hammerstedt RH, Graham JK. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* **29**:26–38.

Hermes R, Hildebrandt TB, Blottner S, Walzer C, Silinski S, Patton ML, Wibbelt G, Schwarzenberger F, Göritz F. 2005. Reproductive soundness of captive southern and northern white rhinoceroses (*Ceratotherium simum simum*, *Cs cottoni*): evaluation of male genital tract morphology and semen quality before and after cryopreservation. *Theriogenology* **63**:219-38.

History of cryopreservation. Available from <https://ivfpga.com/services/cryopreservation/history-of-cryopreservation> (accessed January 11, 2020).

Howard J, Bush M, De Vos V, Wildt DE. 1984. Electroejaculation, semen characteristics and serum testosterone concentrations of free-ranging African elephants (*Loxodonta africana*). *Reproduction* **72**:187-95.

- Howard JG, Brown JL, BUSH M, Wildt DE. 1990. Teratospermic and Normospermic Domestic Cats: Ejaculate Traits, Pituitary—Gonadal Hormones, and Improvement of Spermatozoal Motility and Morphology After Swim-Up Processing. *Journal of andrology* **11**:204-15.
- Hunter M, Boyle R. An Introduction. Available from <http://www.bbk.ac.uk/boyle/learn/introduction> (accessed January 11, 2020).
- Huang Z, Gao L, Hou Y, Zhu S, Fu X. 2019. Cryopreservation of farm animal gametes and embryos: recent updates and progress. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering* **6**:42-53.
- Christoph K, Beck FX, Neuhofer W. 2007. Osmoadaptation of mammalian cells – an orchestrated network of protective genes. *Curr. Genomics* **8**: 209-218.
- Johnston EE, Rand MS, Zweifel SG. 2006. Detection of multiple paternity and sperm storage in a captive colony of the central Asian tortoise, *Testudo horsfieldii*. *Canadian Journal of Zoology* **84**:520-6.
- Johnston SD, Lever J, McLeod R, Qualischefski E, Brabazon S, Walton S, Collins SN. 2014. Extension, osmotic tolerance and cryopreservation of saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) spermatozoa. *Aquaculture* **426–427**:213–221.
- Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* **60**:1249–59.
- KARTHA KK. 1990. Cryopreservation of Plant Cells and Organs CRC Press Inc. Sec. Print 269.
- Kawazu I, Maeda K, Koyago M, Nakada K, Sawamukai Y. 2014. Semen evaluation of captive hawksbill turtles. *Chelonian Conservation and Biology* **13**:271-278.
- Keeley T, McGreevy PD, O'Brien JK. 2012. Cryopreservation of epididymal sperm collected postmortem in the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*). *Theriogenology* **78**:315–325.
- Kitiyant Y, Schmidt MJ, Pavasuthipaisit K. 2000. Evaluation of sperm acrosome reaction in the Asiatic elephant. *Theriogenology* **53**:887-96.
- Koshimoto C, Gamliel E, Mazur P. 2000. Effect of osmolality and oxygen tension on the survival of mouse sperm frozen to various temperatures in various concentrations of glycerol and raffinose. *Cryobiology* **41**:204–231.
- Landowski J, Gill J. 1964. Einige beobachtungen über das sperma des Indischen elefanten (*Elephas maximus* L.). *Zl. Gart., Lpz*, 29:15.
- Leibo SP, Songsasen N. 2002. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology* **57**:303–326.
- Love CC. 1992. Semen collection techniques. *Vet Clin N Am Equine Pract* **8**:111–128.

- Loskutoff N, Simmons H, Goulding M, Thompson G, Jongh T, Simmons L. 1996. Species and individual variations in cryoprotectant toxicities and freezing resistances of epididymal sperm from African antelope. *Anim Reprod Sci* **42**:527– 535.
- Madeddu M, Berlinguer F, Ledda M, Leoni GG, Satta V, Succu S, Carru C. 2009. Ejaculate collection efficiency and post-thaw semen quality in wild-caught Griffon vultures from the Sardinian population. *Reproductive Biology and Endocrinology* **7**: 18.
- Mansour R, Tawab N, Kamal O, El-Faissal Y, Serour A, Aboulghar M, Serour G. 2011. Intrauterine injection of human chorionic gonadotropin before embryo transfer significantly improves the implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a prospective randomized study. *Fertility and sterility* **96**:1370-1374.
- Marco-Jiménez F, Vicente JS, Viudes-de-Castro MP. 2008. Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra ram. *Reprod Domest Anim* **43**:403– 408.
- Mazur P, Leibo SP, Chu EHY. 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Experimental Cell Research* **71**: 345–355.
- Melville DF, Crichton EG, Johnston SD. 2015. Semen collection, ejaculate characteristics and in vitro manipulation of spermatozoa from six species of captive flying-fox (*Pteropus* spp.). *Reproduction, Fertility and Development* **27**:1233-41.
- Méřička P. 2008. K historii Tkáňové úřředny. *SCAN* 2. pages 16-17.
- Molinia FC, Bell T, Norbury G, Cree A, Gleeson DM. 2010. Assisted breeding of skinks or how to teach a lizard old tricks. *Herpetol Conserv Biol* **5**:311-319.
- Morrell JM, Hodges JK. 1998. Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research. *Animal reproduction science* **53**:43-63.
- Millar JD, Watson PF. 2001. Cryopreservation of gametes and embryos in reptiles and amphibians. In: Watson PF, Holt WV (eds) *Cryobanking the genetic resource: wildlife conservation for the future*. Taylor & Francis pp 171–177. New York.
- Moore HD, Taggart DA. 1995. Sperm pairing in the opossum increases the efficiency of sperm movement in a viscous environment. *Biol Reprod* **52**:947–953.
- Mullen SF, Agca Y, Broermann DC, Jenkins CL, Johnson CA, Critser JK. 2004. The effect of osmotic stress on the metaphase II spindle of human oocytes, and the relevance to cryopreservation. *Hum Reprod* **19**:1148–1154.
- Naccache P, Sha'afi RI. 1973. Patterns of nonelectrolyte permeability in human red blood cell membrane. *J Gen Physio* **62**:714–736.
- O'Brien JK, Roth TL. 2000. Post-coital sperm recovery and cryopreservation in the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*) and application to gamete rescue in the African black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Reproduction* **118**:263-71.

- Okano T, Nakamura S, Komatsu T, Murase T, Miyazawa K, Asano M, Tsubota T. 2006. Characteristics of frozen-thawed spermatozoa cryopreserved with different concentrations of glycerol in captive Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *Journal of veterinary medical science* **68**:1101-4.
- Okazaki T, Akiyoshi T, Kan M, Mori M, Teshima H, Shimada M. 2012. Artificial insemination with seminal plasma improves the reproductive performance of frozen-thawed boar epididymal spermatozoa. *Journal of andrology* **33**:990-8.
- Ombelet W, Van Robajs J. Artificial insemination history: hurdles and milestones. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4498171/> (accessed January 11,2020).
- Pegg DE, Day JG, Stacey GN. 2007. Principles of Cryopreservation. In: *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology™*. Humana Press **368**.
- Pegg DE. 2002 The History and Principles of Cryopreservation. *Semin. Reprod Med* **20**:5 – 13.
- Pope CE, Johnson CA, McRae MA, Keller GL, Dresser BL. 1998. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Animal reproduction science* **53**:221-36.
- Pratt SD. 2017. Cryopreservation Freezing Methods and Equipment. Available from <https://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/cryopreservation-freezing-methods-and-equipment-292855> (accessed January 11,2020)
- Quinn PJ, White IG.1967. Active cation transport in dog spermatozoa. *Biochemical Journal* **104**:328.
- RALL WF. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* **24**: 387–402.
- Rapatz G, Luyet B. 1960. Microscopic observations on the development of the ice phase in the freezing of blood. *Biodynamica* **8**:195-239.
- Robeck TR, O'Brien JK. 2004. Effect of cryopreservation methods and precryopreservation storage on bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) spermatozoa. *Biology of reproduction* **70**:1340-8.
- Roca J, Martínez E, Sánchez-Valverde MA, Ruiz S, Vázquez JM. 1992. Seasonal variations of semen quality in male goats: study of sperm abnormalities. *Theriogenology* **38**:115–125.
- Rubinsky B, Arav A, Devries AL. 1992. The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from antarctic fishes. *Cryobiology* **29**:69-79.
- Saint Jalme M, Gaucher P, Paillat P. 1994. Artificial insemination in Houbara bustards (*Chlamydotis undulata*): influence of the number of spermatozoa and insemination frequency on fertility and ability to hatch. *Reproduction* **100**:93-103.
- Santiago-Moreno J, Astorga RJ, Luque I, Coloma MA, Toledano-Díaz A, Pulido-Pastor A, Gómez-Guillamon F, Salas-Vega R, López- Sebastián A. 2009. Influence of recovery method.

and microbial contamination on the response to freezing-thawing in ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal spermatozoa. *Cryobiology* **59**:357–362.

Santiago-Moreno J, Castaño C, Toledano-Díaz A, Estes MC, López-Sebastián A, Guerra R, Hildebrandt TB. 2013. Cryopreservation of aoudad (*Ammotragus lervia sahariensis*) sperm obtained by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands and electroejaculation. *Theriogenology* **79**: 383-391.

Saragusty J, Gacitua H, King R, Arav A. 2006. Post-mortem semen cryopreservation and characterization in two different endangered gazelle species (*Gazella gazella* and *Gazella dorcas*) and one subspecies (*Gazella gazelle acaiae*). *Theriogenology* **66**: 775–784.

Saragusty J, Hildebrandt TB, Behr B, Knieriem A, Kruse J, Hermes R. 2009. Successful cryopreservation of Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **115**:255–266.

Shishova NR, Uteshev VK, Kaurova SA, Browne RK, Gakhova EN. 2011. Cryopreservation of hormonally induced sperm for the conservation of threatened amphibians with *Rana temporaria* as a model research species. *Theriogenology* **7**:220-32.

Schaffer N, Bryant W, Agnew D, Meehan T, Beehler B. 1998. Ultrasonographic monitoring of artificially stimulated ejaculation in three rhinoceros species (*Ceratotherium simum*, *Diceros bicornis*, *Rhinoceros unicornus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **1**:386-93.

Sipek J, Vozdova M, Prinosilova P, Kopecká V. 2019 Sperm and testicular measurements and sperm cryopreservation in the giraffe (*Giraffa*). *European journal of wildlife research* **65**:16.

Societyforcryobiology.org. About the Society. Available from <https://www.societyforcryobiology.org/about-us> (accessed January 11,2020).

Somfai T, Nakai M, Tanihara F, Noguchi J, Kaneko H, Kashiwazaki N, Egeszeki I, Nagai E, Kikuchi K. 2013. Comparison of ethylene glykol and propylene glykol for the vitrification of immature porcine oocytes. *Journal of Reproduction and development* **59**:378-384.

Sundararaj BI, Goswami SV. 1966. Effects of mammalian hypophysial hormones, placental gonadotrophins, gonadal hormones, and adrenal corticosteroids on ovulation and spawning in hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Journal of Experimental Zoology* **161**:287-95.

Sztein JM. 2016. History of cryopresevation. Available from: [https://sarb.weebly.com/uploads/6/8/5/3/68539729/history\\_of\\_cryopreservation\\_2016.pdf](https://sarb.weebly.com/uploads/6/8/5/3/68539729/history_of_cryopreservation_2016.pdf) (accessed January 11,2020)

Tittarelli C, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli MA, De La Sota RL. 2006. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology* **66**:1637–40.

Thachil JV, Jewett MA. 1981. Preservation techniques for human semen. *Fertil Steril* **35**:546–548.

Thurston LM, Watson PF, Holt WV. 2002. Semen cryopreservation: A genetic explanation for species and individual variation? *CryoLetters* **23**: 255–262.

- Towey JJ, Dougan L. 2012. Structural examination of the impact of glycerol on water structure. *J Phys Chem B* **116**:1633–1641.
- Van Den Abbeele, Schneider U, Liu J, Agca Y, Critser JK, Van Steirteghem A. 2007. Osmotic responses and tolerance limits to changes in external osmolalities, and oolemma permeability characteristics, of human in vitro matured MII oocytes. *Hum Reprod* **22**:1959–1972.
- Weber MHW, Marahiel MA. 2002. Coping with the cold. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **357**:895-907.
- Yeste M. 2016. Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* **85**: 47–64.
- Yeste M, Rodríguez-Gil J E, Bonet S. 2017. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. *Molecular reproduction and development*, **84**: 802-813.
- Yu ZW, Quinn PJ. 1994. Dimethyl sulphoxide: A review of its applications in cell biology. *Biosci Rep* **14**:259–281.
- Zajíčková M. 2015. Kryokonzervace: historie a etická problematika skladování embryí. *Čas. Lék. čes.* **154**: 232–235.
- Zambelli D, Prati F, Cunto M, Iacono E, Merlo B. 2008. Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology* **69**:485-90.

