

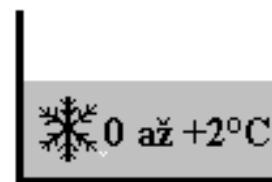
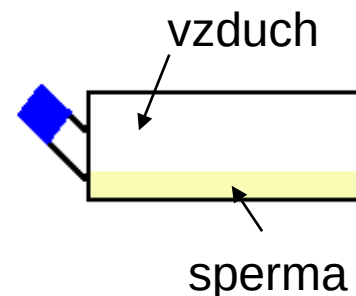
Zmrazování spermií kapra, sumce, lína, veslonosa amerického a jesetera malého

Otázky ke zkoušce

- Zmrazování spermií kapra
- Zmrazování spermií lína
- Zmrazování spermií sumce
- Zmrazování spermií veslonosa
- Zmrazování spermií jesetera malého

Odběr spermat

- Bez kontaminace močí, po odběru kontrola motility spermií, použít jen sperma se 100 % pohyblivostí.
- U sumce a lína s kontaminovaným spermatem odběr vždy do imobilizačních roztoků.
- Sumec - 200 mmol NaCl + 30 mmol trisu, pH 8, nutnost uchování 5 hodin do přidání kryoprotektiva a zmrazení.
- Lín - modifikovaný roztok Kurokura (180 mmol NaCl, 2,7 mmol KCl, 1,4 mmol $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,4 mmol NaHCO_3) poměr 1:1, uchování 3 hodiny do zmrazení.
- Veslonos americký – 50 mM sucrosa, 20 mM tris, pH 8.
- Jeseter malý – 25 mM sukrosa, 1 mM KCl, 30 mM tris, pH 8,5.
- Uchovávat při nula stupních celsia.
- Uchovávat v aerobním prostředí, ideální poměr 1:20



Ředění spermatu

- U kapra po 2-4 h od odběru se sperma ředí tzv. ředícím roztokem Kurokura (130 mmol NaCl + další složky, tzv. roztoku pro kapra) v poměru 1:5 a po 40 minutách se přidává kryoprotektivum.
- U veslonosa amerického a jesetera malého se ředí sperma 1:1 a kryoprotektivum se přidává ihned po naředění spermatu.
- U sumce a lína je sperma již naředěné imobilizačním roztokem.



Důvod ředění spermatu

- Nutnost vnesení stabilizačních látek např. cukrů s kryoprotektivními účinky nebo sodíku snižující aglutinaci spermií.
- U ryb nemají ředidla účinnost vnesení vnějších energetických látek.
- Nutnost naředění spermií tzn. snížení počtu spermií v ml na úroveň maximálně miliard v ml.
- Imobilizační a ředící roztoky jsou v podstatě specificky vybalancované izotonické roztoky.

Kryoprotektivum

- Kryoprotektivum se přidává až na závěr po naředění ředidlem či imobilizačním roztokem.
- U kapra 10 % DMSO.
- U sumce 8 % DMSO.
- U lína 1 díl 4 % propandiolu + 1 díl 4 % DMSO.
- U veslonosa 8 % methanol.
- U jesetra malého 5 % methanol.
- Kryoprotektivum – velmi rychle pronikne do buňky a vytlačí z buňky vodu, funkcí kryoprotektiva je usměrnění krystalů při krystalizaci s jednotnou strukturou a orientací, snižuje se roztrhání buněk.
- DMSO je nevhodné kryoprotektivum u spermií s akrozomem.

Ekvilibrace

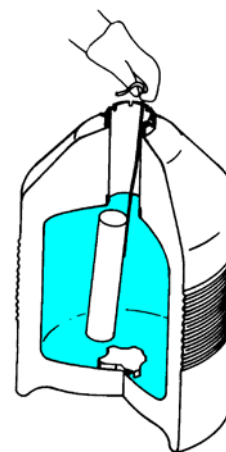
- Ekvilibrace – tzn. čas nutný k vyrovnání vnějších a vnitřních podmínek v buňce.
- Ekvilibrace po naředení imobilizačním roztokem u sumce – 5 hodin, lína 3 h, u kapra po naředení 40 min, veslonosa amerického a jesetra melého bez ekvilibrace. Vysvětlení spočívá ve zlepšení energetiky spermií po naředení imobilizačním či ředícím roztokem.
- Ekvilibrace po přidání kryoprotektiva se neprovádí – ihned se zmrazuje.

Zmrazované objemy

- U kapra a lína kryo zkumavky 2 ml s objemem 1 ml nebo pejety 0,5 ml.
- U sumce a veslonosa amerického kryo zkumavky 4 ml se zmrazovaným objemem 4 ml nebo pejety 0,5 ml.
- Možnost použití pejet různých objemů 0,25 ml-5 ml; u jesetera malého zmrazování do 0,5 ml pejet (viz ukázka metodiky).
- Zásada - čím menší objem tím lepší výsledek zmrazení. Při zmrazování dochází k postupné krystalizaci od stěn zkumavek do středu zmrazované látky s tím, že uprostřed zmrazovaného objemu je hyper osmotická koncentrace, která poškozuje buňky.

Zmrazování postupné u kapra, lína, sumce a veslonosa s použitím zmrazovacího automatu

- Zmrazování z $+4^{\circ}\text{C}$ do -9°C , rychlostí 4°C za minutu.
- Potom od -9°C do -80°C , rychlostí 11°C za minutu.
- Dále se udržuje 6 minut teplota -80°C .
- Následně se dávky přenesou do -196°C a uchovávají v této teplotě v Dewarových kontejnerech.



Možnosti zmrazování a zásady při zmrazování

- **Prahové zamrazování – se v současnosti obecně používá k zmrazování spermatu kapra, lína, sumce a jeseterů. Pejety se popíší speciální laiserovou tiskárnou. Pejety o objemu 0,5 ml se přenesou do teploty -110 až -130 °C a po 10 minutách do -196 °C.**
- Obecná zásada – čím rychlejší zmrazení, tím lepší výsledek.
- Nutnost překonání období krystalizace, začíná u výše uvedených druhů okolo -7 až -9 °C, zásada co nejrychlejší převedení látky ze skupenství kapalného do skupenství pevného.
- Krystaly mají schopnost růstu a to do -40 °C intenzivně, do -80 °C omezeně, do -130 °C velmi omezeně a při -196 °C již krystaly nerostou.
- Jakékoliv zvýšení teploty nad -40 °C vede k postupné destrukci buněk, velmi významné při teplotě -20 °C.
- Vitifikace – takřka bez krystalizace, super rychlé zmrazení.

Uchovávání zmrazených dávek spermatu

- V kontejnerech o objemech 32 l.
- Doba uchování více či méně neomezená.
- Popsané kryo zkumavky/pejety jsou vloženy do speciálních tub, držáků, patron a kanistrů s evidencí.
- Kontejnery jsou opatřeny hlásiči teploty a musí se pravidelně dolévat dusíkem. Dávky musí být stále ponořené v kapalném dusíku.

Rozmrazení

- Zásada - čím rychlejší tím lepší výsledek.
- V teplé lázni 40 °C po dobu 110 s v případě zmrazených dávek v kryo zkumavkách. V případě pejet je to pouze 6 s.
- Okamžitě po rozmrazení uchovávat při 0 až +2 °C a použít k osemenění.

Oplození

- Jedna rozmrazená dávka spermatu kapra a lína se používá na 10 g jiker, u sumce na 100 g jiker.
- Musí se vyhodnotit procento pohyblivých spermií, rychlost pohybu spermií, oplozenost, případně líhnivost.
- Osemenění a aktivace gamet musí proběhnout současně a to z důvodu nutného naředění kryoprotektiva. Kryoprotektivum je toxické pro jikry.