



Česká zemědělská
univerzita v Praze



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Inovativní postupy v procesu kryokonzervace spermatu genetického
zdroje původního plemene česká slepice zlatá kropenatá**

Autorský kolektiv:

Martina Janošíková, Kristýna Petričáková, Lukáš Zita

ISBN 978-80-213-3238-6

2022

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Inovativní postupy v procesu kryokonzervace spermatu genetického zdroje původního plemene česká slepice zlatá kropenatá

Vydavatel

Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha-Suchdol

Forma vydání

Metodika je vydána pouze elektronicky ve formátu PDF.

Zveřejněno na webové stránce

<https://metodiky.agrobiologie.cz/>

Autoři a jejich podíl na tvorbě certifikované metodiky

Ing. Martina Janošíková, Ph.D. 40 %

Ing. Kristýna Petričáková 30 %

doc. Ing. Lukáš Zita, Ph.D. 30 %

ČZU v Praze, FAPPZ, KCHHZ

Oponenti certifikované metodiky

Ing. Zdeňka Majzlíková

Česká plemenářská inspekce, Praha

doc. Ing. Jan Beran, Ph.D.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Dedikace na projekty

Metodika vznikla v rámci řešení výzkumných projektů MŠMT SGS grantu SV21-6-21320 a MZe NAZV QK 1910156.

Rok vydání

2022

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky bylo navrhnout optimalizovaný postup kryokonzervace spermií kohoutů plemene česká slepice zlatá kropenatá, plemene patřícího do genetických zdrojů. Optimalizace postupu bylo dosaženo prostřednictvím modifikací dostupných ředidel ejakulátu drůbeže určených pro krátkodobou konzervaci vybranými kryoprotektanty a testováním jejich optimálních koncentrací. Pro ověření úspěšnosti realizovaných modifikací byly hodnoceny vybrané parametry (motilita; MOT) a integrita plazmatické membrány a akrozomu (viabilita; VIA) připravených inseminačních dávek (ID) před a po rozmrazení. Hlavním cílem bylo na základě získaných dat zefektivnit účinnost modifikovaných médií a zpracovat doporučení vyplývající z výsledků a získaných zkušeností autorského kolektivu.

II. Vlastní popis metodiky

II.1 Úvod

Česká slepice zlatá kropenatá je dnes jediným původním plemenem kura, které vzniklo na našem území a posledním klasickým představitelem původních středoevropských selských slepic lehkého typu s unikátním zbarvením (Kraus et al. 2022). Je mimořádně vhodné pro podmínky tradičně pojatých volných či ekologických chovů. Od roku 1996 je plemeno zařazeno do programu ochrany původních plemen, od roku 2006 je součástí národního programu pro záchranu a uchovávání zemědělské rozmanitosti. Cílem tohoto programu je i vytvoření *in vitro* reservoáru dlouhodobě konzervovaných ID prostřednictvím kryokonzervace, použitelných například v případě ohrožení populací nákazou ptačí chřipky aj.

Kryokonzervace je proces, který díky řadě stresových podnětů snižuje fertilizační schopnost spermií drůbeže až o 100 % (Shanmugam et al. 2018) v porovnání s nativním ejakulátem. Základním předpokladem úspěšného dlouhodobého uchování spermií je alespoň 80% motilita nativního ejakulátu a minimální počet spermií s morfologickými abnormalitami. Výskyt primárních morfologických změn u >15 % spermií automaticky vyřazuje ejakulát z dalšího zpracování. Stejně je tomu i u sekundárních morfologických změn, vzniklých neodbornou manipulací. Proto se kolektiv autorů zaměřuje také na způsob a průběh odběru ejakulátu.

V procesu přípravy inseminačních dávek se používají ředidla pro krátkodobé uchování ejakulátu. Tato ředidla na bázi sacharidů nejsou schopna poskytnout protektivní účinek v procesu mrazení. Základem pro tato ředidla byla receptura složená z glukózy, glutamanu sodného, citronanu draselného, octanu sodného a octanu hořečnatého (Lake 1960), a proto bylo obohacení o kryoprotektivní složky nezbytné.

Statisticky významná variabilita byla zjištěna v množství, kvalitě i mrazitelnosti ejakulátu jednotlivých samců. Z toho důvodu byly všechny naše experimenty prováděny ze směsného vzorku několika samců stejného plemene. Směsný vzorek snížil efekt individuality jedince a

ejakulát směsných vzorků tak splňoval požadavky pro výrobu ID. Pro zachování kvalitativních a kvantitativních parametrů nativního ejakulátu byla optimální četnost odběrů dvakrát za týden. Období odběrové abstinence nesnižovalo kvalitu hodnocených parametrů, ale spíše ochotu samců k odběru. Tato metodika se zabývá kryokonzervací ejakulátu genetického zdroje plemene česká slepice zlatá kropenatá. Z toho důvodu nebyl hodnocen efekt plemenné příslušnosti.

Zásadním kladem práce s drůbežím ejakulátem a ověřením kvality inseminační dávky *in vivo* je velmi krátký čas od inseminace do identifikace oplozených vajec. Prosvícení vajec úspěšně inseminovaných slepic již 7. den zřetelně identifikuje cévní síť (Lierz et al. 2006). Kritickým bodem dodržení postupu je proces inseminace. Reinseminace je realizována 4. den, vždy po snášce (Tselutin et al. 1995).

II.2 Vlastní kryokonzervační protokol

Odběr ejakulátu

Ejakulát kohoutů se získává technikou dorzo-abdominální masáže (Burrows et Quinn 1935) a nevyžaduje stimulační přítomnost samic, jako je tomu u savců. Osoba provádějící odběr drží kohouta za běháky a současně fixuje jeho hlavu v podpaží. Dorzo-abdominální masáž je prováděna obvykle pravou rukou (u praváků) směrem od hrudní kosti ke kloace. Poté se těsně před ejakulací stiskne kloaka pro vychlípění kopulační papily. Přítomný technik provede sběr ejakulátu do sběrné nádoby. Vzhledem k malému objemu ejakulátu lze odběr realizovat také pomocí laboratorní pipety (viz Obrázek 1). Délka odběru trvá do 20 sekund. Rutinní osvojení této techniky je nezbytné. Neodbornou manipulací při odběru může dojít k výskytu příměsí krve v ejakulátu. Odběr semene by měl být prováděn vždy stejnou osobou ve stejnou denní dobu optimálně dvakrát za týden (Lin et al. 2021).



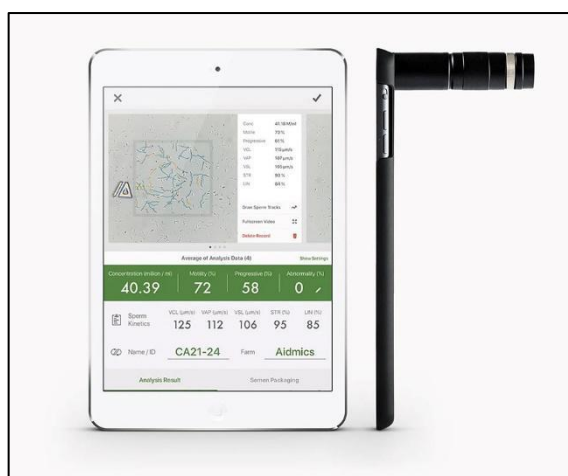
Obrázek 1: Odběr ejakulátu (foto: kolektiv autorů)

Na odběr ejakulátu je doporučované navykací období 14 dnů, po kterém jsou kohouti schopni uvolnit maximální množství ejakulátu (Madeddu et al. 2016). Odebraný ejakulát se skladuje při teplotě 5 °C až do zpracování. Zpracovány jsou pouze ty vzorky, které splňují následující kritéria: objem >0,2 ml, koncentrace >3 × 10⁹ spermií/ml a pohyblivost spermií >80 %. Odběr je vhodné provádět do průhledné kalibrované nádoby, avšak pro velmi malé množství se přesný objem stanoví až v laboratoři. Po celou dobu manipulace je vyžadována odborná způsobilost z důvodu náchylnosti spermií na teplotní změny, mechanické poškození i riziko znehodnocení ejakulátu spermicidními látkami.

Sperma použité pro tuto metodiku bylo odebíráno kohoutům ustájeným ve stabilních klimatických podmínkách Demonstračního a experimentálního pracoviště České zemědělské univerzity v Praze (50°07'47.6''N 14°22'07.0''E): teplota vzduchu cca 20 °C, vlhkost vzduchu 50-60 %. V době odběru nebyly ve stáji přítomny žádné další osoby, což snižovalo stresové reakce kohoutů a zvyšovalo úspěšnost odběru.

Hodnocení kvality ejakulátu

Ihned po odběru se makroskopicky zhodnotí objem, barva, zápach, vzhled a obsah cizích příměsí. Ejakulát, ve kterém se vyskytly příměsí krve nebo je kontaminován trusem je automaticky vyřazen. V laboratorních podmínkách se mikroskopicky hodnotí koncentrace, která významně ovlivňuje barvu ejakulátu, motilita vyjadřující celkový počet aktivních spermií a morfologie. Koncentrace a motilita spermií se hodnotí pomocí mCASA (iSperm[®], Aidmics Biotechnology, Taipei City, Taiwan; viz Obrázek 2).



Pro přesnost měření motility je nezbytné naředění vzorku ejakulátu podle doporučení výrobce na standardní koncentraci 30 × 10⁶ spermií/ml použitým komerčním ředidlem bez přidaného kryoprotektantu. U takto připraveného vzorku se snímají minimálně 3 náhodná pole s následným vyhodnocením kinematických parametrů spermií. Koncentrace spermií v

kvalitním nativním ejakulátu vhodného k přípravě kryokonzervované ID by měla být $>100 \times 10^6$ s více než 80 % aktivních spermií. Manuálním ekvivalentem metody mCASA pro stanovení motility může být kalibrovaná počítací komůrka Leja® s hloubkou 20 μm (IMV, L'Aigle, France), pro stanovení koncentrace Bürkerova komůrka. Doporučená koncentrace pro tento způsob hodnocení je stejná jako pro hodnocení pomocí mCASA 30×10^6 spermií/ml. Přítomnost abnormálních spermií by neměla přesáhnout 15 % (Clarke et al. 1984). Mezi morfologické abnormality spermií ptáků patří zkroucení nebo vakuolizace hlavičky spermie, nepřítomnost akrozomu a stočení nebo nepřítomnost bičíku (Long et al. 2014).

Tuto škálu testů hodnotících kvalitu ejakulátu lze rozšířit o stanovení viability. Viabilita spermií je vyjádřena integritou plazmatické membrány a akrozomu a je významným ukazatelem kvality především u zmrazeného ejakulátu. Tyto parametry jsou hodnoceny průtokovým cytometrem (NovoCyte 3000®, Acea Biosciences, Agilent, Santa Clara, California, USA; viz Obrázek 3) za použití fluorescenčních barviv o uvedených koncentracích: Hoechst - 33342 (H-342); 16,6 $\mu\text{g/ml}$ (identifikace přítomnosti DNA), propidium iodide (PI); 13,3 $\mu\text{g/ml}$ (poškození plazmatické membrány) a PNA lektin (PNA-FITC); 0,83 $\mu\text{g/ml}$ (detekce akrozomálního poškození).



Vzorky se ředí fosfátovým roztokem (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) na konečnou koncentraci $10 \times 10^6/\text{ml}$ a barví fluorescenčními barvivami při teplotě 38,5 °C po dobu 15 minut. Dodavatelem H-342 a PI je společnost Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), dodavatelem PNA-FITC společnost Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Průtokový cytometr byl vybaven fialovým (405 nm), modrým (488 nm) a červeným (640 nm) laserem a příslušnými optickými filtry pro detekci emitovaných fluorescenčních signálů. H-342 lze úspěšně excitovat fialovým (405 nm) laserem (Martinez-Pastor et al. 2010). Pro sběr a analýzu dat byl použit software NovoExpress, v1.3.0 (Acea Biosciences, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Stejný software byl použit také k analýze získaných dat průtokové cytometrie.

Příprava inseminačních dávek

Za účelem výroby kryokonzervované ID se ejakulát po odebrání a vstupním zhodnocení ředí v komerčně dostupných ředidlech Poultry media[®] (IMV Technologies, L'Aigle, Francie) a Raptac[®] (AMP-Lab, GmbH, Německo) obohacených o kryoprotektant N-methylacetamid (NMA) o koncentraci 9 % (Mosca et al. 2016). Veškerá média se udržují při teplotě 5 °C. Finální koncentrace je 100 × 10⁶/ml buněk. Inseminační dávky se mrazí v 0,25 ml plastových pejetách francouzského typu (IMV Technologies, L'Aigle, Francie). Pejety lze plnit velkokapacitně automatickou plničkou IMV-MRS3 (IMV Technologies, L'Aigle, Francie), nebo v případě malých objemů (jako je tomu u kohoutů) manuálně. K manuálnímu plnění lze použít pipetu. Po nasazení pejety na špičku pipety se nasaje požadovaný objem. Takto naplněná pejeta se uzavře pomocí sytkého PVA (polyvinylalkohol) a umístí se na plovoucí rack do par tekutého dusíku (5 cm nad hladinou) po dobu 10 minut (Madeddu et al. 2016) pro zchlazení optimální rychlostí. Zchlazené pejety se následně ponoří přímo do kapalného dusíku (-196 °C). K poškození membrán dochází právě v procesu mrazení, proto je v tomto bodě třeba striktně dodržovat mrazící křivku. Příliš rychlé mrazení způsobuje ireverzibilní poškození cytoplazmatické membrány, membrány akrozomu, nebo dvojí poškození. Mrazení ID probíhá v polystyrenovém mobilním mrazícím boxu (komerční mrazící box Minitube, GmbH). Zmrazené ID se k dlouhodobému uchování přemístí do skladovacího kontejneru s tekutým dusíkem.

Postup rozmrazení inseminačních dávek

Pro zhodnocení kvality vyrobených ID se pejety rozmrazí podle stejného protokolu, jako před jejich použitím při inseminaci. Pro vyjmutí ze zásobního kontejneru se závěs s ID vysune do hrdla tak, aby bylo možné identifikovat jednotlivé goblety/pejety umístěné v závěsu. Zároveň se celý závěs nesmí dostat mimo páry tekutého dusíku, tj. nesmí být výše než hrdlo kontejneru. Jedná se o kritický bod, kdy je třeba realizovat co možná nejrychlejší manipulaci. V případě pobytu mimo kontejner dochází k bezprostřednímu nežádoucímu tání ID v pejetách. Při opětovném ponoření zpět do tekutého dusíku znovu mrznou, což vede k jejich znehodnocení. Vybrané pejety se uchopí peanem nebo pinzetou a jsou ponořeny do vodní lázně temperované na 5 °C po dobu 100 sekund (Sasaki et al. 2010). Po rozmrazení jsou ID hodnoceny stejným způsobem jako před mrazením.

III. Porovnání inovativních postupů („novosti“)

Inseminace hluboce zmrazeným ejakulátem hraje nezastupitelnou roli v procesu šlechtění hospodářských zvířat, avšak ekonomicky relevantní metody uchování drůbežích gamet pro rutinní kryokonzervaci nejsou aktuálně technicky zvládnuté. Novým přínosem této metodiky je navržený postup kryokonzervace z hlediska potřeby uplatnění v praxi. Publikovaným

výsledkům předcházelo systematické studium odborné literatury, na které navazovalo experimentální ověření hypotéz výzkumnou činností autorů.

Nabízená komerční ředidla jsou navržena pro krátkodobé uchování ejakulátu drůbeže. Přežitelnost spermií v takto připravených dávkách je např. u Poultry media® (IMV Technologies, L'Aigle, Francie) deklarována v jeho patentu po dobu 24 hodin v rozmezí teplot 5-10 °C. Protože ředidla pro dlouhodobou konzervaci nebyla doposud vyvinuta, realizují vědecké týmy optimalizaci nabízených přípravků pomocí přísad kryoprotektivních látek. Kryoprotektanty se v zásadě dělí podle jejich schopnosti penetrovat buněčné membrány na prostupné (CPA) a neprostupné (N-CPA). CPA jsou charakteristické schopností prostoupit buněčnou stěnou a zabránit vzniku ledových krystalů v procesu kryokonzervace. Mezi CPA testovaná při optimalizaci ředidel určených primárně pro krátkodobou konzervaci patří např. methylacetamid (NMA), dimethylacetamid (DMA), dimethylsulfoxid (DMSO), glycerol (GLY) nebo ethylenglykol (EG) (Whaley et al. 2021). Pozitivita jejich kryoprotektivních vlastností je kompenzována jejich toxicitou v nesprávné koncentraci. N-CPA plní stejnou protektivní funkci bez prostupu do buňky. Jejich kreditem je nižší toxicita, a proto je možné je kombinovat s CPA v nižších koncentracích. Do této skupiny se řadí např. low density lipoprotein (LDL), polyvinylpyrrolidon (PVP), polyethylenglykol (PEG), sacharóza (SACH), trehalóza (TRE).

Inovace postupů spočívá v kombinaci kryoprotektivních látek s komerčními přípravky pro krátkodobé uchování ejakulátu s cílem dlouhodobého uchování hluboce zmrazených ID. Tato kombinace vybízí k testování a optimalizaci koncentrací kryoprotektivních látek pomocí hodnocení kvality ID, které prošly procesem přípravy, mrazením a rozmrazením a ověření výsledků in vivo technikou umělé inseminace. Pakliže tyto dávky splňují požadavky kladené na ID po stránce motility a viability, jsou inovativní postupy cestou k řešení problému dlouhodobého uchování ID drůbeže.

IV. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika nabízí podrobný postup procesu kryokonzervace s odkazem na vědecké publikace kolektivu autorů, ale i primární zahraniční zdroje a navrhuje metody kryokonzervace kohoutích spermií. Může sloužit jako doplňující materiál pro chovatelské subjekty a poskytovat tak chovatelům návod pro výrobu a dlouhodobé uchování hluboce zmrazených ID drůbeže. Uvedené poznatky mohou sloužit také jako podpůrný výukový materiál pro školy a vědecko-výzkumné týmy. Předkládaná certifikovaná metodika slouží k ověření kryokonzervačního protokolu, který doposud nebyl aplikován v chovatelské praxi. Inseminační dávky lze využít také pro komerční účely a uplatnění v chovatelských zařízeních. Daná metodika bude využívána podnikem Líheň Studenec, s.r.o. v souladu s platnou legislativou.

V. Ekonomické aspekty

Metoda dlouhodobého uchování ID generuje pozitivní ekonomické efekty snížením nákladů spojených s držetím potřebného množství samců a množstvím inseminovaných samic. V přirozené plemenitbě se jeden kohout může pářit se šesti až deseti slepicemi. Při využití umělé inseminace se tento poměr může zvýšit až čtyřnásobně (Asmarawati et al. 2019). Zároveň v důsledku kontroly kvality ejakulátu nedochází k přenosu infekcí a používání nevhodných samců. Do plemenitby jsou tak zařazováni vybraní jedinci samčího pohlaví, kteří zvýší kvalitu potomstva a umožní vytvoření genových rezerv v podobě hluboce zmrazených ID.

VI. Seznam použité související literatury

- Asmarawati, W.; Kustono, D.; Widayati, T.; Bintara, S.; Aji, R.N.; Ismaya. Fertility duration of commercial laying hen inseminated with native chicken semen. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 2019, 387(1).
- Burrows, W.H.; Quinn, J.P. A Method of Obtaining Spermatozoa from the Domestic Fowl. Poultry Sci. 1935, 14, 251–253.
- Clarke, R. N.; Bakst, M. R.; Ottinger, M. A. Morpho-logical changes in chicken and turkey spermatozoa incubated under various conditions. Poultry Science 1984 63(4), 801-805.
- Kraus, A.; Kront, O.; Zita, L.; Vejvodová, K.; Drábek, O. Laying hens under smallholder conditions: laying performance, growth and bone quality of tibia and femur including essential elements. Poultry Science 2022, 101, 101927.
- Lake, P.E. Studies on the dilution and storage of fowl semen. Reproduction 1960, 1(1), 30-35.
- Lierz, M.; Gooss, O.; Hafez, H.M. Noninvasive Heart Rate Measurement Using a Digital Egg Monitor in Chicken and Turkey Embryos. Journal of Avian Medicine and Surgery. 2006, 20(3), 141-14.
- Lin, H.H.; Blesbois, E.; Vitorino Carvalho, A. Chicken semen cryopreservation: importance of cryoprotectants. World's Poultry Science Journal 2021, 78(1), 139-160.
- Long, J.A. Applied andrology in chickens and turkeys. In: Chenoweth, P.; Lorton, S. ed. Animal andrology: theories and applications. UK: CABI, 2014, 2014-01-30, s. 197-225.
- Madeddu, M.; Mosca, F.; Abdel Sayed, A.; Zaniboni, L.; Mangiagalli, M.G.; Colombo, E.; Cerolini, S. Effect of cooling rate on the survival of cryopreserved rooster sperm: Comparison of different distances in the vapor above the surface of the liquid nitrogen. Anim. Reprod. Sci. 2016, 171, 58–64.

- Martínez-Pastor, F.; Mata-Campuzano, M.; Álvarez-Rodríguez, M.; Álvarez, M.; Anel, L.; De Paz, P. Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. *Reproduction in Domestic Animals* 2010, 45, 67-78.
- Mosca, F.; Madeddu, M.; Abdel Sayed, A.; Zaniboni, L.; Iaffaldano, N.; Cerolini, S. Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the quality of frozen/thawed chicken sperm. *Cryobiology* 2016, 73, 343–347.
- Sasaki, K.; Tatsumi, T.; Tsutsui, M.; Niinomi, T.; Imai, T.; Naito, M.; Tajima, A.; Nishi, Y. A Method for Cryopreserving Semen from Yakido Roosters Using N-Methylacetamide as a Cryoprotective Agent. *J. Poult. Sci.* 2010, 47, 297–301.
- Shanmugam, M.; Pranay-Kumar, K.; Mahapatra, R.K.; Laxmi, N.A. Effect of different cryoprotectants on post-thaw semen parameters and fertility in Nicobari chicken. *Indian Journal of Poultry Science* 2018, 53(2).
- Tselutin, K.; Narubina, L.; Mavrodina, T.; Tur, B. Cryopreservation of poultry semen. *Br Poult Sci.* 1995 Dec;36(5):805-11.
- Whaley, D.; Damyar, K.; Witek, R.P.; Mendoza, A.; Alexander, M.; Lakey, J.R.T. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplantation* 2021, 30.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Petričáková, K.; Janošíková, M.; Ptáček, M.; Zita, L.; Savvulidi, F.G.; Partyka, A. Comparison of Commercial Poultry Semen Extenders Modified for Cryopreservation Procedure in the Genetic Resource Program of Czech Golden Spotted Hen. *Animals* 2022; 12(20):2886. <https://doi.org/10.3390/ani12202886>.
- Janošíková, M.; Petričáková, K.; Ptáček, M.; Savvulidi, F.G.; Rychtářová, J.; Fulka, J. NEW APPROACHES FOR LONG-TERM CONSERVATION OF ROOSTER SPERMATOZOA. *Poultry Science* 2022. <https://doi:10.1016/j.psj.2022.102386>.
- Janošíková, M.; Ptáček, M.; Savvulidi, F.G.; Zita, L.; Petričáková, K. Kryoprotektivní účinky modifikovaných ředidel drůbežního spermatu. *Náš chov* 11/2022.
- Petričáková, K.; Janošíková, M.; Ptáček, M.; Zita, L.; Savvulidi, F.G. Comparison of Commercial Poultry Semen Extenders Modified for Cryopreservation Procedure in the Genetic Resource Program of Czech Golden Spotted Hen. *Book of Abstracts of the 1st CZU hybrid seminar on animal reproduction, sperm and analysis: an international experience 2022, Praha, Česká republika, 3.5.2022, s. 20-21.* <https://doi.org/10.5281/zenodo.7153051>.