

**Česká zemědělská univerzita v Praze**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra chovu hospodářských zvířat**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Porovnání komerčních a modifikovaných ředidel pro  
konzervaci ejakulátu u vybraných genových zdrojů  
hospodářských zvířat**

**Diplomová práce**

**Bc. Michaela Králová**

**Výživa zvířat a dietetika**

**Ing. Martina Janošíková, Ph.D.**

**© 2022 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Porovnání komerčních a modifikovaných ředidel pro konzervaci ejakulátu u vybraných genových zdrojů hospodářských zvířat" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu použitých zdrojů na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4. 2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Martině Janošíkové, Ph.D. za veškeré rady a čas stráveným nad konzultacemi během psaní diplomové práce a také za velkou psychickou oporu po celý čas. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Kristýně Petričákové za pomoc se zpracováním dat v experimentální části a Ing. Filippu Georgijeviči Savvulidi Ph.D. za odborné vedení v laboratoři. Nesmím ani opomenout zmínit svoji rodinu, která mě po celou dobu studia velmi podporovala.

# Porovnání komerčních a modifikovaných ředidel pro konzervaci ejakulátu u vybraných genových zdrojů hospodářských zvířat

## Souhrn

Česká slepice zlatá kropenatá patří mezi geneticky ohrožené druhy a byla zařazena do genových zdrojů. Pro uchování inseminačních dávek kohoutů uvedeného plemene byla porovnána komerční ředidla ejakulátu drůbeže s přísávkem kryoprotektantu.

Do ředidel Poultry media<sup>®</sup>, Raptac<sup>®</sup> a NeXcell<sup>®</sup> byl přidán penetrující kryoprotektant n-methylacetamid v koncentraci 9 %. Inseminační dávky balené v pejetách o objemu 0,25 ml byly vyráběny ze směsného vzorku ejakulátu od 4 kohoutů stejného věku drženy ve stejných podmínkách prostředí a výživy v Pokusné a demonstrační stáji ČZU v Praze. Kohouti byli krmeni krmnou směsí s deklarovaným složením vyrobenou pro ČZU v Praze.

Odběr ejakulátu probíhal v lednu a únoru 2022. Pomocí CASA iSperm<sup>®</sup> (Aidmics Biotechnology Co., Ltd, Taipei, Taiwan) byly hodnoceny parametry celkové motility spermií v doporučeném poměru ředění před mražením a po rozmražení inseminačních dávek. Poškození plazmatické membrány (PMD), přítomnost DNA, poškození akrozomu (ACRD) a dvojí poškození (PAD) bylo hodnoceno pomocí průtokového cytometru (Novocyte 3000<sup>®</sup>, Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, California, USA).

Celková motilita byla na hladině významnosti  $p < 0,0001$  nejvyšší u ředidla Poultry media<sup>®</sup>, nejhorších výsledků dosahovala u ředidla NeXcell<sup>®</sup> ( $p < 0,05$ ).

K nejvyššímu poškození plazmatické membrány došlo na hladině významnosti  $p < 0,0001$  u ředidla NeXcell<sup>®</sup>, k poškození akrozomu u ředidla Poultry media<sup>®</sup> ( $p < 0,0001$ ) a ke dvojímu poškození na hladině významnosti  $p < 0,0001$  u ředidla NeXcell<sup>®</sup>.

Jako nejvhodnější pro kryokonzervaci spermatu se ukázala ředidla Poultry media<sup>®</sup> a Raptac<sup>®</sup> s přísávkem 9% NMA. Jako nejméně vhodné bylo označeno ředidlo NeXcell<sup>®</sup>. Je třeba brát v úvahu individualitu v kvalitě ejakulátu jak mezi jednotlivci, tak mezi odběrovými dny. Pro stanovení optimálního ředidla s optimální koncentrací kryoprotektantu pro výrobu inseminačních dávek drůbeže je třeba provádět další analýzy.

**Klíčová slova:** Kryokonzervace, N-methylacetamid, kohout, ejakulát

## Summary

The Czech golden spotted hen is a genetically endangered species and has been included in the genetic resources. Commercial diluents of poultry ejaculate with the addition of cryoprotectant were compared for the preservation of insemination doses of roosters of that breed. A penetrating cryoprotectant was added to Poultry media<sup>®</sup>, Raptac<sup>®</sup>, and NexCell<sup>®</sup> extenders n-methylacetamide at a concentration of 9 %. Insemination doses packed in 0.25 ml straws were produced from a mixed sample of ejaculate from 4 roosters of the same age kept under the same environmental and nutritional conditions in the Experimental and Demonstration Barn of the Czech University of Life Sciences in Prague. The roosters were fed with the feed mixture with the declared composition produced for the CULS in Prague.

Ejaculate collection was carried out in January and February 2022. Using CASA iSperm<sup>®</sup> (Aidmics Biotechnology Co., Ltd, Taipei, Taiwan), the parameters of progressive sperm motility were evaluated at the recommended dilution ratio before freezing and after thawing of insemination doses. Plasma membrane damage (PMD), presence of DNA, acrosome damage (ACRD) and double damage (PAD) were assessed using a flow cytometer (Novocyte 3000<sup>®</sup>, Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, CA, USA).

Total motility was highest for diluent Poultry media<sup>®</sup> at the significance level  $p < 0.0001$ , and worst results were observed for diluent NeXcell<sup>®</sup> ( $p < 0.05$ ).

Plasma membrane damage was highest at the significance level  $p < 0.0001$  for diluent NexCell, acrosome damage for diluent Poultry media<sup>®</sup> ( $p < 0.0001$ ), and double damage at the significance level  $p < 0.0001$  for diluent NeXcell<sup>®</sup>.

The diluent Poultry media<sup>®</sup> with the addition of 9% NMA was found to be the most suitable for sperm cryopreservation. The least suitable diluent was NeXcell<sup>®</sup>. Individuality in ejaculate quality both between individuals and between sampling days should be taken into account. Further analyses are needed to determine the optimal diluent with the optimal concentration of cryoprotectant for the production of poultry insemination batches.

**Keywords:** Cryopreservation, N-methylacetamide, rooster, ejaculate

# Obsah

1	Úvod .....	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce .....	9
3	Literární rešerše .....	10
3.1	Pohlavní ústrojí ptáků.....	10
3.1.1	Morfologie spermií .....	11
3.2	Rozdíly mezi drůbeží a savčí spermií.....	13
3.2.1	Polynasyčené mastné kyseliny v membránách .....	14
3.3	Neurohumorální řízení u ptáků .....	15
3.4	Krátkodobá konzervace spermatu v inseminaci drůbeže .....	15
3.4.1	Skladování chlazeného spermatu.....	16
3.5	Ředidla ejakulátu drůbeže .....	17
3.5.1	Typy ředidel .....	18
3.5.1.1	Japonské ředidlo.....	18
3.5.1.2	Lake ředidlo .....	18
3.5.1.3	Poultry media ředidlo .....	18
3.5.1.4	NeXcell ředidlo .....	19
3.5.1.5	Cari ředidlo .....	19
3.5.1.6	Raptac ředidlo .....	19
3.5.1.7	Beltsville ředidlo (BPSE).....	19
3.5.1.8	BPSE obohacené o Quercetin .....	19
3.5.1.9	BPSE obohacené o L-Carnitin .....	20
3.6	Kryokonzervace .....	21
3.7	Kryoprotektanty .....	22
3.7.1	Běžně používané kryoprotektanty .....	23
3.8	Antioxidanty.....	24
3.9	Průtoková cytometrie .....	24
3.10	Počítačem asistovaná analýza spermií CASA.....	26
4	Metodika .....	27
4.1	Zvířata zařazená do experimentu .....	27
4.2	Odběr a zpracování ejakulátu .....	27
4.3	Příprava inseminačních dávek, mražení.....	28
4.4	Hodnocení inseminačních dávek pomocí průtokové cytometrie .....	28
5	Statistická analýza dat .....	30
6	Výsledky .....	31

<b>6.1</b>	<b>Výsledky CASA .....</b>	<b>31</b>
<b>6.2</b>	<b>Výsledky průtokové cytometrie .....</b>	<b>32</b>
6.2.1	Základní charakteristiky – průtoková cytometrie.....	32
6.2.2	Procentuální zastoupení viabilních spermíí po rozmražení .....	33
6.2.2.1	Popis modelu .....	33
6.2.2.2	Vliv odběrového dne na viabilitu spermíí po rozmražení .....	33
6.2.2.3	Vliv použitého ředidla na viabilitu spermíí po rozmražení .....	35
6.2.2.4	Vliv teploty ekvibrace po rozmražení .....	35
6.2.3	Procentuální zastoupení spermíí s poškozenou cytoplazmatickou membránou, poškozeným akrozomem a poškození akrozomu a cytoplazmatické membrány .....	36
6.2.3.1	Popis modelu .....	36
6.2.3.2	Vliv odběrového dne na poškození cytoplazmatické membrány .....	36
6.2.3.3	Vliv zvoleného ředidla na poškození cytoplazmatické membrány .....	38
<b>7</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>41</b>
<b>8</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>44</b>
<b>9</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>45</b>
<b>10</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>53</b>
<b>11</b>	<b>Seznam obrázků, tabulek a grafů.....</b>	<b>54</b>
<b>12</b>	<b>Samostatné přílohy .....</b>	<b>55</b>

# 1 Úvod

Zachování genetických zdrojů původních plemen na území ČR je hlavním cílem Národního programu genetických rezerv. Jako genetický zdroj se označuje „živý materiál obsahující geny s bezprostřední nebo potenciální hodnotou pro lidstvo“. Díky reprodukčním biotechnologiím, jako je umělá inseminace a kryokonzervace pohlavních buněk, můžeme zachránit nebo udržet plemena pro nás významná. Zajímavostí je, že doposud nebyl zjištěn přesně daný postup pro proces kryokonzervace kohoutího spermatu. Pro zachování plemene České zlaté kropenaté a ostatních plemen drůbeže je důležité objasnit problematiku kryokonzervace. Téma kryokonzervace u drůbeže je důležité z ekonomického hlediska. Pokud by došlo k úspěšné kryokonzervaci u drůbeže, tak by bylo možné ve velkochovech snížit počet kohoutů, kteří jsou chováni pouze na odběr genetického materiálu pro inseminaci.

Česká zlatá kropenatá je plemeno, které se chová na území České republiky již po staletí. Vlivem importu nových plemen hrozí České zlaté kropenaté pomalý, ale jistý zánik. Počátkem 20. století získalo plemeno současnou podobu a bylo zapsáno r. 1922 do genetických zdrojů ČR. V roce 2020 bylo evidováno pouze 259 kusů na území ČR.



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

### **Cíl práce**

Cílem práce bylo porovnat vliv přídatku 9% NMA do různých komerčních ředidel ejakulátu na kvalitu inseminační dávky.

### **Hypotéza**

Lze předpokládat, že 9% koncentrace NMA aplikovaná do různých komerčních ředidel ejakulátu pozitivně ovlivní motilitu spermií po rozmrazení.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Pohlavní ústrojí ptáků

Na rozdíl od samců savců je pohlavní ústrojí ptáků uloženo v dutině břišní. Část rozmnožovací soustavy je ukryta v kloace, což je rozšířená část konečníku. Jedná se o zakončení trávicí trubice, která má společné vyústění jak pro vývodné, tak i pro pohlavní cesty. Kloaka jako celek je dutý orgán, který vznikl spojením *corpodea*, což je konečná část trávicího kanálu, která dále navazuje na *urodeum*, vývodné místo močových a pohlavních cest. Toto zakončení se označuje jako *proctodeum* (viz Obrázek 1) (Červený 2000).

Varlata samců jsou párový orgán fazolovitého nebo vejčitého tvaru, který je zavěšen pod páteří a uložen ventrálně směrem k cefalické straně ledvin. Pomocí vaziva *mesochria* jsou uchycena k tělní dutině. Vazivem prochází krevní a inervace varlat. Prokrvení je u ptačích druhů méně složité, než je tomu u savců, protože ptáci nemají *plexus pampini*, který u savců plní funkci udržení nižší teploty varlat, než je teplota těla. Zajištění nižší teploty je nezbytné pro kvalitu pohlavních buněk a proces spermatogeneze. Ochlazení varlat zajišťuje cirkulace vzduchu ve vzdušných vacích, díky tomu jsou během noci varlata ochlazována. V klidovém stavu jsou varlata malá, ale během reprodukční sezóny se jejich velikost může zvětšit 300 až 500krát. U dospělých samců bývá levé varle větší než pravé (Červený 2000).

Varlata se skládají z řady svinutých semenotvorných tubulů a pojivové tkáně, která je značně prostoupená krevní kapilárou a Leydigovými (nebo intersticiálními) buňkami. Semenotvorné tubuly se skládají ze Sertoliho buněk a zárodečných epitelárních buněk (kmenové spermatogonie). Leydigovy buňky jsou zodpovědné za steroidogenezi a sekreci androgenu (Scanes et al. 2020)

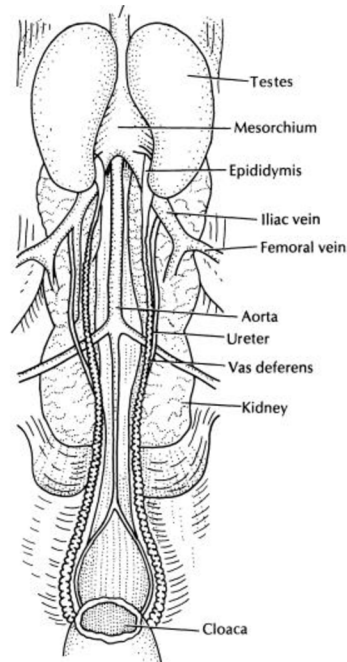
Zralé spermie ze semenných tubulů procházejí do tubulární sítě, pak do vysoce svinuté *vasa efferentia*. Spermie jsou uloženy v *ductus deferens*. Předpokládá se, že strukturální diferenciací spermií je dokončena předtím, než opustí tubulární síť. Motilita ve varlatech je minimální (Johnson et al. 1968).

Předpokládá se, že fertilizační kapacita spermií drůbeže se zvyšuje při průchodu *ductus deferens*. Existují důkazy, že Sertoliho buňky i epitelární buňky nadvarlete mohou resorbovat spermie (Scanes et al. 2020).

Krev proudí do každého varlete z abdominální aorty. Pomocné pohlavní reprodukční orgány samce kohouta zahrnují *vasa efferentia*, *epididymis*, *ductus deferens*, ejakulační rýhu a penis. Penis kohouta se označuje jako *phallus*, je nevysunutelný a nalezneme ho na spodině kloaky. *Phallus* je tvořen hrbolky, které jsou v malé míře schopné erekce. K erekci penisu dochází vnitřním složením kloaky s erektilní lymfou. Na povrchu kloaky jsou řasy, které se stočí a tvoří speciální semenný kanálek, kterým po ejakulaci sperma pasivně stéká (Červený 2000).

Ptáci nemají žádné přídavné orgány jako je prostata, bulbouretrální žláza nebo semenný váček. Semenná plazma pochází z *vasy efferentia* a semenotvorných tubulů.

Pomocné kopulační orgány, jako jsou parakloakální cévní tělíska, pomáhají po erekci se zatažením *phallu* (Scanes et al. 2020).

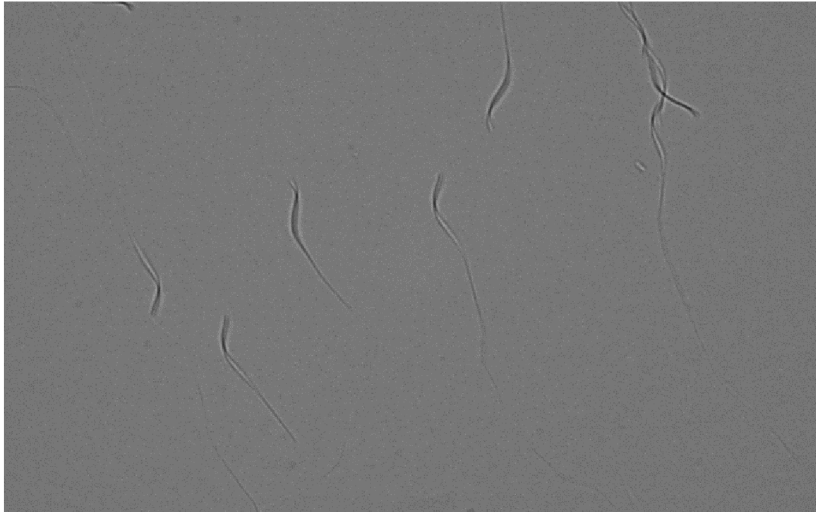


Obrázek 1: Pohlavní ústrojí ptáků (Johnson 1986)

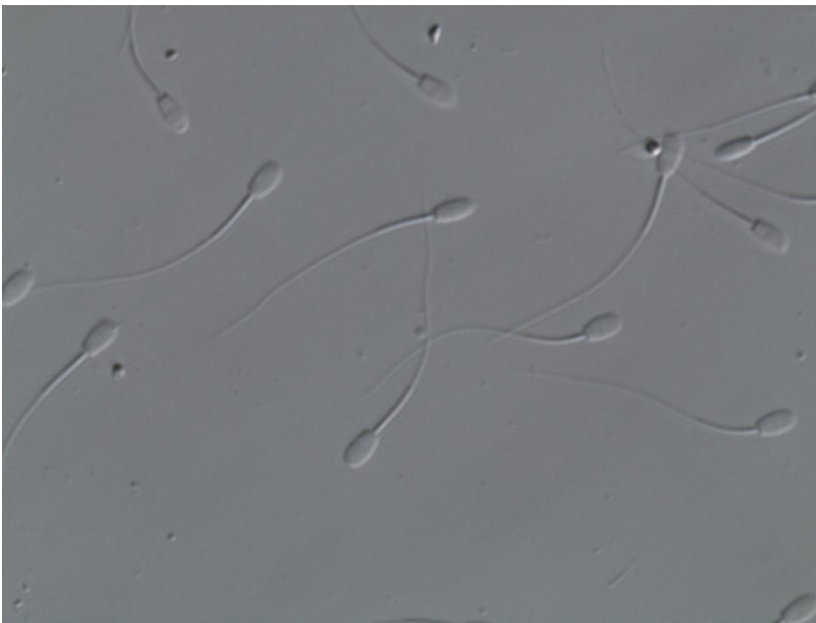
### 3.1.1 Morfologie spermií

Savčí spermie se od aviárních spermií liší morfologicky (viz Obrázek 2 a 3). Důvodem je rozdílná stavba reprodukčních orgánů a rozdílnost spermatogeneze. Pohlavní buňka samce ptáka je podlouhlá, cylindrická a její zvláštností je zúžení na obou koncích (viz Obrázek 4), v porovnání se savci je menší. Jedním z hlavních znaků ejakulátu kohouta je velmi nízký obsah semenné plazmy zdůvodněný absencí přídatných pohlavních žláz. To má za následek, že semeno je husté a koncentrace spermií dosahuje od 2 do  $10 \cdot 10^9$  (Blesbois & Hermier 2003). Koncentrace spermií se také odvíjí od genotypu, stáří kohouta a frekvence odběrů. Koncentrace spermií se rapidně snižuje častým nebo dlouhodobým odběrem.

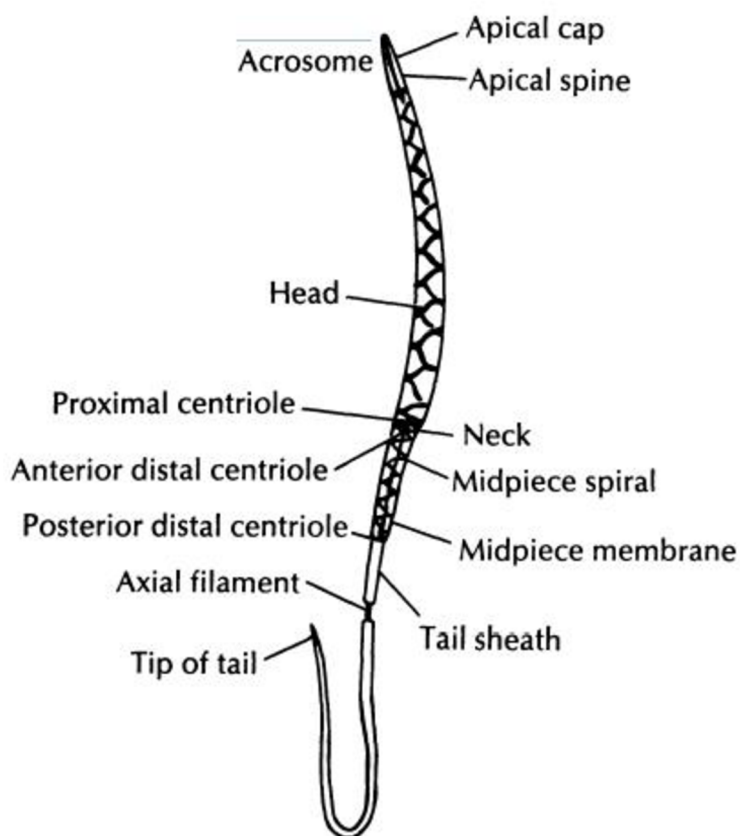
Akrozom obsahující proteolytické enzymy k rozštěpení glykoproteinového obalu vajíčka je zapouzdřený buněčnou membránou. Jádro je uloženo v hlavičce spermie (Etches 2000; Scanes et al. 2020).



*Obrázek 2: Spermie kohouta (vlastní zdroj)*



*Obrázek 3: Spermie berana (vlastní zdroj)*



Obrázek 4: Popis drůbeží spermie (Johnson et al. 1968)

### 3.2 Rozdíly mezi drůbeží a savčí spermii

Drůbeží spermie jsou morfologicky odlišné od savčích spermii nitkovitým tvarem hlavičky spermie (viz Obrázek 4). V důsledku nižšího obsahu cytoplazmy tak mají nižší schopnost pohybu v kryoprotektantech. Drůbeží spermie mají relativně dlouhý ocas v porovnání například s ocasem spermie býka. Délka ocasu spermie u drůbeže dosahuje délky mezi 90 a 100  $\mu\text{m}$ . Nevýhodou dlouhoocasé spermie je snadné poškození v průběhu procesu zmrazování a rozmrazování. Elektronová mikroskopie ukázala, že až 60 % organel spermii drůbeže trpí po kryokonzervaci nevratným poškozením (Çiftci & Aygün 2018).

Plazmatická membrána spermii se skládá z lipidů, cholesterolu a bílkovin. Mezi hlavní vlivy cholesterolu na drůbeží spermie patří regulace stability membrány, acylové pořadí řetězců fosfolipidů, následná regulace a vlastnosti funkce membrány. Udržuje příznivé mikroprostředí pro membránové proteiny (Çiftci & Aygün 2018).

Vliv cholesterolu na fluiditu membrán závisí na teplotě. Při teplotách nad fázovým přechodem je hodnota cholesterolu v plazmatické membráně vysoká. To má za následek snížení fluidity membrány, což činí spermie náchylnější k chladovému šoku a dochází ke snížení schopnosti spermii přežít proces zmražení a rozmražení (Blesbois et al. 2005; Buffone et al. 2009; Partyka et al. 2016).

Při teplotách pod fázovým přechodem cholesterol zvyšuje fluiditu membrány. Tento účinek cholesterolu je významnější v membránách bohatých na nasycené fosfolipidy, ve srovnání s těmi, které obsahují nenasycené kyseliny (Partyka et al. 2016; Çiftci & Aygün 2018).

Fluiditu plazmatické membrány lze určit měřením za použití fluorescenčního barviva. Hodnoty odpovídají tuhosti membrány a jsou nepřímo úměrné fluiditě membrány (Blesbois et al. 2005; Çiftci & Aygün 2018).

### **3.2.1 Polynasycené mastné kyseliny v membránách**

Drůbeží sperma je náchylnější vůči chladovému šoku díky vysokému poměru polynenasycených mastných kyselin v plazmatické membráně.

Polynenasycené mastné kyseliny ve spermatu drůbeže snadno podléhají peroxidaci lipidů, které způsobují poškození spermií (Aitken et al. 2012; Long 2006). Zvýšená produkce ROS snižuje fosforylaci axonemových proteinů, což má za následek snížení fluidity membrány a dochází k nehybnosti spermií.

Plazmatické membrány kohoutích spermií obsahují vysoký podíl n-6 a nízký podíl n-3 polynenasycených mastných kyselin (PUFA). Podílové zastoupení PUFA se odlišuje mezi jednotlivými druhy ptáků. N-6 PUFA zahrnuje hlavně cis-7,10,13,16-dokosatetraenovou kyselinu (22:4n-6) a má u drůbeže majoritní zastoupení ve spermatu oproti savcům, kde je minoritní (Blesbois & Hermier 2003). U savců je vyšší zastoupení polynenasycených mastných kyselin n-3, zejména kyseliny dokosahexaenové (22:6n-3) (Kelso et al. 1997).

Blesbois & Hermier (2003) zkoumali vliv krmné dávky obohacené o PUFA na odolnost plazmatické membrány u kohoutích a krůtích spermií v první polovině reprodukčního období. Dospělí kohouti byli rozděleni do dvou skupin. První skupina byla krmena standardní krmnou dávkou a druhá skupina byla krmena standardní krmnou dávkou obohacenou o n-3 PUFA (pocházející z rybího oleje). Obohacená krmná dávka o n-3 PUFA vedla k jednoznačnému celkovému zvýšení podílu n-3 PUFA (22:5n-3 a 22:6n-3) ve spermiích u kohoutů. N-3 PUFA měly také pozitivní účinek na plodnost u čerstvého spermatu kohoutů. Bylo potvrzeno, že obohacení krmné dávky o n-3 zvyšují i reprodukční výkonnost u kohoutů (Blesbois & Hermier 2003).

### 3.3 Neurohumorální řízení u ptáků

Hladiny hormonů v těle ptáků jsou regulovány ročním obdobím s cílem líhnutí v období hojnosti. Pomocí smyslových orgánů jsou přijímány podněty z vnějšího prostředí a následně zpracovány v kůře mozkové a hypotalamu. Gonadotropní hormony *realising factors* produkované hypotalamem ovlivňují proces hormonální regulace stimulací adenohipofýzy. Gonadotropiny přímo ovlivňují sekreci hormonů v hierarchicky nižších orgánech (Froman et al. 2000).

Mezi hormony adenohipofýzy jsou řazeny:

- Adrenokortikotropní hormon (ACTH)
- Tyreotropní hormon (TSH)
- Folikulostimulační hormon (FSH)
- Luteinizační hormon (LH)
- Somatotropin (STH)
- Prolaktin (PRL)

Výše zmíněný folikulostimulační hormon ovlivňuje spermatogenezi, jelikož iniciuje tvorbu samčích pohlavních buněk, růst folikulů u samic a produkci estrogenu. Luteinizační hormon působí na Leydigovy buňky, díky tomu pak dochází ke stimulaci testosteronu. Společné působení folikulostimulačního a luteinizačního hormonu má za následek přeměnu testosteronu, který je ve stěně vaječníku, na estrogen, což je podnět pro tvorbu progesteronu a následnou ovulaci (Scanes et al. 2020). Prolaktin může inhibovat činnost vaječníků a tím ovlivnit snůšku (Hu & Zadworny 2017).

### 3.4 Krátkodobá konzervace spermatu v inseminaci drůbeže

Nejčastěji používanou technikou reprodukce v drůbežářském průmyslu je umělá inseminace. Umělá inseminace umožňuje využití genetického potenciálu nejkvalitnějších plemenů. Ve srovnání s přirozenou reprodukcí umožňuje umělá inseminace oplodnění většího množství samic a snížení nákladů na množství držených samců. Základem úspěšné inseminace je oplození schopné sperma o dostatečném objemu. Odběry probíhají v blízkosti slepic (Mohan et al. 2018).

První historické zmínky o umělé inseminaci drůbeže jsou z roku 1899. Ruský vědec Ivanow studoval umělou inseminaci u domácích hospodářských zvířat včetně drůbeže. Odběr spermatu probíhal fyzickým pářením kohouta se slepicí. Po páření byly slepice zabity a sperma bylo chirurgicky odebráno z vejcovodu. Jak z popisu výše plyne, metoda umělé inseminace byla v těchto dobách velmi drastická a stala se podnětem vývoje současných moderních technik inseminace.

V roce 1935 Burrows a Quinn vynalezli techniku abdominální masáže břicha kohoutů pro získání ejakulátu. Tato technika se využívá v chovech dodnes. Jedná se o tzv. „břišní masážní metodu“ (Mohan et al. 2018).

#### **3.4.1 Skladování chlazeného spermatu**

Pro skladování chlazeného spermatu je zásadní teplota a vhodné ředidlo. Standardní teplota pro uchování chlazeného ejakulátu je 5 °C. Při této teplotě dochází ke snížení metabolismus spermií. Brillard (2009) uvedl, že pro dlouhodobější skladování spermatu je třeba se vyvarovat teplotám okolo 0 °C.

Pro 24hodinové skladování drůbežního spermatu je vhodné použití ředidel Lake a Beltsville (BPSE). Navzdory jejich úspěšnému použití v drůbežářském průmyslu existuje stále vysoká variabilita oplození (Siudzińska & Łukaszewicz 2008).

Dále bylo prokázáno, že zředěné drůbeží sperma může být skladováno až po dobu 24 hodin, aniž by došlo ke zhoršení viability (Siudzińska & Łukaszewicz 2008). Nejběžnější postup pro krátkodobé skladování spermatu drůbeže v chladničce vyžaduje skladování spermatu v ředidle, tak aby se zachovala jejich životaschopnost *in vitro*. Díky použití ředidel je tedy možné přepravovat sperma na vzdálenější drůbežárny k inseminaci velkých skupin slepic a zvýšit tak využití kvalitního spermatu (Parker & McDaniel 2006).

Volba ředidla, které je vhodné pro krátkodobé uskladnění závisí na znalosti biologických, fyziologických a metabolických požadavků drůbežního spermatu. Drůbeží spermie jsou metabolicky kompetentní v aerobních a anaerobních podmínkách prostředí *in vitro*. Aerobní metabolismus vyžaduje provzdušňování spermatu. To se běžně provádí umístěním zředěného spermatu do baňky, aby se maximalizoval poměr povrchu a objemu. Rychlost ředění a typ ředidla mají významný vliv na motilitu spermií, iontovou rovnováhu, výměnu plynů a využití ATP. Pro *in vitro* prostředí se za optimální skladování drůbežního spermatu považuje trojnásobné ředění neboli střední ředění (Parker & McDaniel 2006).



### 3.5 Ředidla ejakulátu drůbeže

V současné době existuje řada komerčních ředidel používaných pro ředění spermatu drůbeže s různými modifikacemi (Siudzińska & Łukaszewicz 2008).

Ředidla jsou pufované solné roztoky používané k prodloužení životaschopnosti kvalitního spermatu. Pro zabránění vzniku aglutinace z důvodu vysoké koncentrace spermatických buněk je nezbytné použití vhodného ředidla a poměru ředění. Vývoj ředidel začal jednoduchým použitím roztok chloridu sodného a až později došlo k rozvoji komplexních ředidel obsahujících osmotické regulátory, energetické substráty a pufrы (Mohan et al. 2018). Pufovací činidla jsou složena ze směsi kyselin a jejich konjugovaných bází přidávaných k omezení změn hodnot pH. Obvykle obsahují směs fosfátů, citrátů a organických zwitteriontových molekul, jako je N-bis 2-hydroxyethyl-2-aminoethansulfonová kyselina, označovaná jako BES a N-Tris hydroxymethyl methyl-2-kyselina aminoethansulfonová označovaná jako TES. V ředidlech u drůbežního spermatu jsou důležité zwitteriontové molekuly, protože při delším skladování spermatu dochází k hromadění kyseliny mléčné. Pro udržení homeostázy spermií a přežití spermií pomáhá izotonický roztok glutamátu sodného. Ředidla drůbežního spermatu respektují biochemické složení drůbežního semene. Standardní složkou ředidel se stala kyselina glutamová.

Tématem porovnávání složení různých známých a dostupných ředidel se zabývala řada studií. Z důvodu značné variability v designu experimentu (frekvence odběru a počet inseminací) nelze doporučit obecně používané ředidlo pro drůbeží sperma (Siudzińska & Łukaszewicz 2008). Podobný scénář platí i v případě snahy hodnocení plodnosti na základě výhod různých ředidel. Důvodem je, že všechna ředidla mají společné základní charakteristiky, přesněji základním úkolem ředidel je udržení konstantního pH a osmolality. Jako zdroj energie jsou využívány monosacharidy ve formě glukózy a fruktózy nebo disacharidy ve formě trehalósy. Další důležitou složkou jsou antibiotika, protože mohou snížit případnou přítomnost patogenu, ale ne všechna ředidla je obsahují. Hodnota pH může být ovlivněna rychlostí metabolismu a motilitou spermií v průběhu mražení a po rozmražení (Pearlin et al. 2020). Pomocí pH ředidel lze měnit motilitu a rychlost metabolismu spermií. Nízké pH snižuje motilitu. Lake & Ravie (1979) ve své studii uvádí, že pH o hodnotě 6,8 a 7,1 zlepšilo viabilitu spermií oproti ředidlům s výrazně nižším (5,8) nebo vyšším (7,4) pH.

Drůbeží spermie zředěné v ředidlech o osmolalitě v rozmezí od 250 do 460 mOsm/kg si zachovávají svou schopnost pohybu. V případech, kdy se spermie dají do ředidla, kde je nízká osmolalita, dochází k průniku vody do spermií, což způsobuje jejich bobtnání a jedná se o nežádáný efekt. Vlivem hyperosmotických tlaků, který je na spermie vyvíjen, dojde ke zvýšení výskytu deformovaných a znehodnocených spermií bezprostředně po zředění, což negativně koreluje s plodností (Siudzińska & Łukaszewicz 2008).

### 3.5.1 Typy ředidel

#### 3.5.1.1 Japonské ředidlo

Dané ředidlo obsahuje následující:

- 1,2 g glutamátu sodného
- 0,3 g octanu draselného
- 3,8 g trehalózy
- 0,2 g glukózy
- 0,5 g N-Bis(2-hydroxyethyl) 2- aminoethansulfonové kyseliny (BES)
- 0,5 g Bis(2-hydroxyethyl) iminotris(hydroxymethyl) methanu (Bis-tris)
- Gentamicin sulfát 0,001 g na 100 ml destilované vody (360 mOsm/kg, pH 6,8)

#### 3.5.1.2 Lake ředidlo

Dané ředidlo obsahuje následující:

- 1,92 g monohydrát L-glutamátu sodného
- 0,5 g octanu draselného
- 0,08 g tetrahydrát octanu draselného
- 0,8 g glukózy
- 0,3 g polyvinylpyrrolidonu a 100 ml vody (343 mOsm/kg, pH 7,08)

Di Iorio et al. (2020) ve své studii tvrdí, že Lake ředidlo má skvělé výsledky, pokud se inseminace provádí pouze chlazeným ejakulátem. Při splnění této podmínky byly zaznamenány výrazně vyšší hodnoty plodnosti a líhivosti. Dále se zkoumáním získaných výsledků *in vitro* ukázalo, že Lake ředidlo zachovalo progresivní motilitu spermií i po rozmrazení. Tyto výsledky lze přičíst k jeho složení. Lake ředidlo je doporučeno k dalšímu sledování, protože mělo zajímavé výsledky u kryokonzervace (Herrera et al. 2017).

#### 3.5.1.3 Poultry media ředidlo

Dané ředidlo obsahuje následující:

- fosforečnan draselný
- glutamát sodný
- fruktózu
- octan sodný, citrát draselný, chlorid hořečnatý
- N-tris hydroxymethylovou kyselinu
- methyl-2-aminoethansulfonovou kyselinu
- fosfatidylcholin a zinek
- případně kyselinu sialovou
- carnitin, serinethanolamin, fosfodiesterázu nebo jejich směsi

Poultry media ředidlo, jak už z názvu vyplývá, bylo přizpůsobeno speciálně pro drůbež. Jedná se o unikátní složení, které by mělo zajistit přežití spermií v ředidle až po dobu 24 hodin při teplotě 5 °C. Ředidlo má různé varianty, a to jak s antibiotiky, tak i bez antibiotik. Toto ředidlo bylo použito v našem experimentu (viz Příloha I).

#### 3.5.1.4 NeXcell ředidlo

NeXcell ředidlo bylo vyvinuto pro krátkodobé skladování spermatu drůbeže bez použití antibiotik. Toto médium bylo obohaceno o antioxidanty (viz Příloha II).

#### 3.5.1.5 Cari ředidlo

Cari ředidlo drůbežního spermatu bylo vyvinuto v ICAR-CARI, Ústředním výzkumném ústavu pro ptáky se sídlem v Izatnagaru, Indii (Mohan 2018). Toto ředidlo bylo porovnáno s dalšími ředidly (Tselutin et al. 1995). Po analýze spermatu u různých druhů drůbeže bylo zjištěno, že CARI ředidlo vykazovalo vynikající motilitu při skladování spermatu a dokonce i vyšší fertilitu než ostatní. Pro toto tvrzení jsou nutné další pokusy, aby došlo k potvrzení těchto výsledků (Mohan et al. 2017).

#### 3.5.1.6 Raptac ředidlo

Raptac ředidlo je úspěšně používáno v reprodukci jestřábů. Jedná se o ředidlo speciálně vyvinuté pro uchování spermatu dravců. Je zbarveno červeně a neobsahuje antibiotika. Jeho intenzivní barva podporuje homogenní promíchání spermatu a ředidla (viz Příloha III).

#### 3.5.1.7 Beltsville ředidlo (BPSE)

Dané ředidlo obsahuje následující:

- monohydrát citrátu draselného
- L-glutamát sodný
- chlorid hořečnatý
- fruktózu
- trihydrát hydrogenfosforečnanu draselného
- jednosytný fosforečnan draselný
- TES n-tris (hydroxymethyl) methyl 1,2 kyselina aminoethansulfonová
- trihydrát octanu sodného

#### 3.5.1.8 BPSE obohacené o Quercetin

Quercetin (Q) je v přírodě vyskytující se látka, která se nachází v mnohé zelenině, ovoci, v listech, semenech atd. Má schopnost inhibovat oxidace jiných biologických molekul.

Existence polyfenolické substruktury v Q působí jako vychytávač volných radikálů, které jsou zodpovědné za řetězové reakce a oxidace (Boots et al. 2008).

Recentní studie se zabývaly a hodnotily účinky různých koncentrací Q v BPSE na kvalitu kohoutího spermatu. Hodnotily se různé parametry: motilita, funkčnost membrány, abnormální morfologie, peroxidace lipidů, mitochondriální aktivita a životaschopnost. Dále byl hodnocen stav apoptózy a fertilita po rozmražení (Siari et al. 2021).

Studie Silva et al. (2012) potvrdila, že přídavek Q měl pozitivní účinky na kvalitu spermatu po rozmražení u beranů, hřebců (Seifi-Jamadi et al. 2016), býků (Tvrdá et al. 2016) i kanců (Silva et al. 2016).

Také Ahmed et al. (2019) uvedli, že přídavek Q měl pozitivní vliv na kvalitu spermií u buvolů. Toto tvrzení potvrdili ve své studii i Rakha et al. (2020) u plemene *Gallus gallus murghi*. Kdy po přidání 15 mM Q byly po rozmražení všechny výše zmíněné parametry pozitivně ovlivněny a mimo jiné se snížila hodnota malondialdehydu (MDA, produkt peroxidace polynenasycených mastných kyselin). Appiah et al. (2020) ve svých studiích uvedli, že přidání Q do ředidla na bázi kaseinu zlepšilo kvalitu kohoutího spermatu.

Výše zmíněné studie ukazují, že obohacení ředidla o 10-15 mM Q má pozitivní vliv na parametry motility spermií. Naopak přidání vysoké koncentrace 20 mM Q potlačila jeho příznivé účinky na motilitu.

Nejvyšší procento spermií s aktivními mitochondriemi bylo pozorováno při použití 10 mM Q (Siari et al. 2021). Také došlo ke zlepšení funkčnosti membrány, mitochondriální aktivity a životaschopnosti. Navíc použití 10 mM Q mělo za následek apoptické změny a peroxidaci lipidů u buněk kohoutích spermií po rozmražení (Siari et al. 2021). Závěrem lze říci, že doplnění BPSE o 10 mM Q by mohlo být vhodnou metodou ke zlepšení kvality kohoutího ejakulátu po rozmražení (Siari et al. 2021).

### 3.5.1.9 BPSE obohacené o L-Carnitin

Beltsville ředidlo obohacené o (LC) je další zajímavou modifikací, s cílem celkově zlepšit parametry rozmraženého kohoutího spermatu.

L-Carnitin (LC) je ve vodě rozpustná aminokyselina, která hraje klíčovou roli při tvorbě metabolické energie spermií (Hinton et al. 1979).

Vyšší pohyblivost a funkčnost membrány spermií lze přičíst roli LC v metabolismu. LC usnadňuje transport aktivovaných mastných kyselin přes membránu mitochondrií ( $\beta$ -oxidaci a produkci ATP), čímž je rychleji dodávána energie pro pohyb spermií. LC také zvyšuje aktivitu a hladinu antioxidantních enzymů, jako je superoxiddismutáza a glutathion. Hromadění ROS ve spermiích navíc vede k destrukci membrány a také k vyčerpání zásob ATP, což může negativně ovlivnit kvalitu spermií.

Výše zmíněné pozitivní vlastnosti LC by mohly být zodpovědné za zlepšení pohyblivosti a funkčnosti membrány kohoutích spermií během kryokonzervace (Fattah et al. 2017).

Přidávky různých koncentrací LC nemělo vliv na morfologii a mitochondriální aktivitu. Výsledky ukázaly, že doplnění BPSE o 1 až 2 mM LC významně zlepšilo kvalitu kohoutího spermatu po rozmražení (Fattah et al. 2017). Rovněž bylo zjištěno, že pyruvátový systém je

efektivnější, když je LC pro spermie přístupný (Stradaioli et al. 2000). Nicméně je důležité, aby bylo působení L-Carnitinu nadále sledováno v dalších experimentech pro své slibné stávající výsledky.

### 3.6 Kryokonzervace

Kryokonzervace je metoda, která se využívá pro dlouhodobé uchování genetického materiálu. Díky kryokonzervaci jsme schopni uchovat různý biologický materiál, jako jsou spermie, vajíčka ale i embrya. Pro úspěšnou kryokonzervaci je velmi důležitý správný metodický postup a výběr ideálních kryoprotektantů. Přidání kryoprotektantů je nezbytnou součástí kryokonzervace, protože chrání buňky při procesu zmrazování tekutým dusíkem. Ke zmražení dochází postupným ochlazováním v parách dusíku. Dále jsou vzorky přeneseny do finálních  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Struktura buněk je zachována díky postupnému ochlazování a velmi nízkým teplotám v průběhu uskladnění.

Přestože se jedná o významnou metodu, nese si i svá negativa, jako je kryopoškození. Kryopoškození ovlivňuje funkci a kvalitu spermií, jako je pohyblivost spermií, stav membrány, stav akrozomu, mitochondriální potenciál, také peroxidaci lipidů a poškození DNA (Svoradová et al. 2021).

Mezi hlavní faktory, které mohou ovlivnit kvalitu spermatu při procesu zmražení, je koncentrace kryoprotektantů, použití vhodného ředidla, systém plnění do pejet a následná rychlost chlazení. Kryokonzervace zvyšuje intracelulární koncentraci iontů během mražení, což způsobuje chemické poškození buněk. Kryoprotektanty byly vyvinuty, aby snížily rozsah chemického poškození, ke kterému dochází během zmrazování. Bez použití kryokonzervantů dochází ke zvýšení intracelulární koncentraci iontů což má za následek chemické poškození buňky (Rubinsky et al. 2005).

Postupy pro mražení jsou odlišné, odvíjí se od již aplikovaných protokolů. Rychlost mražení je závislá na výšce racku. Nicméně výška racku není fixně stanovena a je variabilní, což potvrzují i provedené studie. Aboulez et al. (2017) ve svém pokusu provedli mražení za použití kryoprotektantu glycerolu v dusíkových parách ve výšce racku 7 cm nad hladinou dusíku. Tseulin et al. (1995) provedli mražení za pomoci kryoprotektantu DMA ve výšce racku 11 cm. Oproti tomu Chuaychu et al. (2017) použili odlišnou metodu za použití kryoprotektantu DMF. Racky umístili do výšky 11 cm nad hladinu kapalného dusíku po dobu 12 minut, poté rack přemístili 3 cm od hladiny kapalného dusíku po dobu 5 minut. Pejety byly následně ponořeny do kapalného dusíku při  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Kryokonzervace spermatu patří mezi nejúčinnější metody uchování genetických zdrojů u ohrožených zvířat. Tato metoda je neinvazivní, jak pro dárce, tak i pro příjemce a poskytuje možnost uchování velkého počtu inseminačních dávek (Blesbois et al. 2007). Skutečností ovšem je, že úspěšnost oplození vajíčka zmraženým spermatem je dramaticky nižší ve srovnání s plodností u čerstvého spermatu. Zatím není zcela pochopeno a objasněno, proč proces zmražení a rozmražení snižuje kvalitu inseminačních dávek.

Snížená přežitelnost spermií po rozmražení může být také ovlivněna jedinečnými morfologickými a fyziologickými rysy buněk drůbežního spermatu (Rubinsky et al. 2005; Zaniboni et al. 2014; Thélie et al. 2019).

Jak bylo popsáno výše, hlavní výhodou kryokonzervace je ochrana genetických zdrojů. Existuje několik národních programů (např. ve Francii, Spojených státech amerických a Nizozemsku), které se v současnosti zabývají kryokonzervací drůbežního spermatu, se snahou vytvořit genové banky z důvodu snahy o zachování nejen vzácných plemen (Blesbois 2007).

Drůbeží průmysl je stále závislý na inseminaci čerstvým spermatem. I když z ekonomických důvodů je kryokonzervace výhodnější (Çiftci & Aygün 2018).

Za posledních 15 let bylo provedeno mnoho studií, jak zlepšit metody postupu při procesu zmražení a rozmražení drůbežního spermatu. Navzdory četným pokrokům v kryobiologii spermatu se stále hledají nové metody, ve snaze zlepšit oplozeníschopnost spermií po rozmražení (Thélie et al. 2019).

Důležité ale je zdůraznit, že zatím pro zmíněný proces kryokonzervace neexistuje přesný a ověřený metodický postup. Další výzkumy by však mohly být zaměřeny na hodnocení vhodných kryoprotektantů pro kryokonzervaci kohoutího spermatu (Lin et al. 2022).

### **3.7 Kryoprotektanty**

Přidání kryoprotektantů při kryokonzervaci je důležité z důvodu ochrany buněk před negativními vlivy při mražení. Během kryokonzervace dochází vlivem snižováním teploty ke krystalizaci vody a tvorbě ledových krystalů. Z tohoto důvodu je nutné buňky ochránit před poničením a zánikem. Zmíněné ledové krystaly mechanicky poškozují membránu buňky propíchnutím (Buss 1993).

Kryoprotektanty rozdělujeme na dvě skupiny dle způsobu ochrany buňky na intracelulární a extracelulární. Mezi intracelulární kryoprotektanty patří glycerol (GLY), dimethylsulfoxid (DMSO), dimethylacetamid (DMA), N-methylacetamid (NMA), methylacetamid (MA), ethylenglykol (EG) a dimethylformamid (DMF). Tato skupina kryoprotektantů difunduje přes buněčnou membránu a minimalizuje poškození buněk ledovými krystaly (Donoghue a Wishart 2000). Mezi extracelulární kryoprotektanty patří polyvinylpyrolidon (PVP), polyethylenglykol (PEG), sacharóza, trehalóza (disacharid) a rafinóza (trisacharid). Tento typ kryoprotektantu chrání buňky obalením membrány před mechanickým poškozením (Motta et al. 2014; Thananurak et al. 2019).

Prvním důležitým krokem k úspěšné kryokonzervaci spermatu drůbeže je výběr vhodného kryoprotektiva a jeho aplikace během procesu kryokonzervace. Jak již bylo zmíněno, dlouhočasé spermie kohoutů snadno podlehnou poškození během mražení a rozmražování (Purdy et al. 2009). Použití kryoprotektantů má tedy zásadní roli v procesu mražení a rozmražování drůbežního spermatu.

### 3.7.1 Běžně používané kryoprotektanty

V současné době je jednoznačně nejpoužívanějším kryoprotektantem pro kryokonzervaci drůbežního spermatu glycerol (GLY) a to i přes své známé negativní účinky (Blesbois a Brillard 2007; Blesbois et al. 2007; Thélie et al. 2019). Je dokázáno, že glycerol má nežádoucí antikoncepční účinek. Jedním z možných důvodů může být snížení akrozomové reakce spermií, ačkoliv dosud nebyl objasněn základní mechanismus. V případě použití GLY jako kryoprotektantu je nutné jej před aplikací inseminační dávky vymýt, tak aby došlo ke snížení koncentrace GLY a nepůsobil tak toxicky na drůbeží sperma. Vhodným způsobem odstranění GLY je centrifugace. Jedná se o běžný postup pro snížení koncentrace GLY. Avšak v případě drůbežích spermií je tento postup škodlivý vlivem působícího osmotického tlaku na spermie, který způsobuje negativní mechanické poškození spermie a snížení plodnosti inseminační dávky. Antikoncepční negativní účinky GLY byly pozorovány i v případě další provedené studie, kdy byly zavedeny spermie zředěné s GLY do pochvy slepice o různé koncentraci GLY. Studie zjistila, že v případech, kdy konečná koncentrace GLY přesahuje 2 %, dochází ke snížení fertility, v případě 4 % a vyšší koncentrace GLY nebylo prokázáno oplozené vejce (Blesbois et al. 2011). Je tedy nezbytné vždy před inseminací GLY vymýt (Abouelezz et al. 2015).

Další nevýhodou v případě použití GLY jako kryoprotektantu u drůbežního spermatu je poškození akrozomu výraznějšího rozsahu než v případě použití kryoprotektantu dimethylacetamidu (DMA). Pokles akrozomové reakce byl také výraznější než snížení motility a integrity membrány spermií (Abouelezz et al. 2015). V případě použití GLY v kombinaci s pomalým zmrazováním měl kryoprotektant škodlivější účinky na motilitu spermií než samotný proces kryokonzervace (Mocé et al. 2010).

Mezi další běžně používané kryoprotektanty patří dimethylacetamid (DMA), dimethylsulfoxid (DMSO). Výhodou DMA oproti GLY je jeho neantikoncepční účinek a není tak důvod jej odstraňovat před inseminací (Blesbois et al. 2007). Výhodou použití dimethylsulfoxid (DMSO) a dimethylformamid (DMF) je, že nemusí být odstraněny před inseminací. Nicméně poskytují drůbežím spermiím menší ochranu proti kryodestrukci (Lin et al. 2022).

Mezi novější objevy v oblasti kryoprotektantů pro kryokonzervaci drůbežního spermatu patří využití N-methylacetamidu (NMA). V případě NMA byla prokázána vyšší míra úspěšnosti přežitelnosti spermatu, ve srovnání s DMA (Santiago 2011). Nicméně negativní účinky NMA jsou závislé na míře její koncentrace a projevují se na fertilitě v případě *in vivo*. Odlišné koncentrace kryoprotektantů DMA a NMA mají přímý vliv na kvalitu a plodnost drůbežního spermatu po rozmražení (Mosca et al. 2019).

Mosca et al. (2019) ve své studii popisuje, že při zvýšení koncentrace DMA a NMA z 6 % na 9 %, je částečně zabráněno poškození spermatické membrány, v návaznosti se sníženou motilitou spermií. Avšak podíl rozmražených životaschopných spermií byl zvýšen, i když byly kinetické parametry spermií sníženy (přímočarý pohyb, amplituda laterálního posunu hlavičky, přímot).

### 3.8 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které chrání buňku před oxidativním stresem a vycytávají volné radikály nebo potlačují tvorbu ROS (reaktivní formy kyslíku) (Sikka et al. 2001). ROS jsou reaktivní sloučeniny kyslíku neboli volné kyslíkové radikály. V případě, že tvorba ROS převyší antioxidantní kapacitu organismu produkovat antioxidanty, dojde k vytvoření oxidativního stresu v organismu. Vznikne nerovnováha mezi prooxidanty a antioxidanty. Mezi nežádoucí účinky oxidativního stresu patří snížení počtu gamet, snížení pohyblivosti spermií a zvýšení procentuálního zastoupení mrtvých buněk (Sikka et al. 2001). Lze tedy tvrdit, že nadměrná produkce ROS je jednou ze základních příčin neplodnosti (Sharma & Agarwal, 1996).

Antioxidanty dělíme do dvou skupin na enzymatické a neenzymatické. Mezi enzymatické antioxidanty řadíme superoxidodismutáza (SOD) a glutathion peroxidáza (GSH Px) (Froman & Thurston 1981; Lin et al. 2005; Eid et al. 2006). Mezi neenzymatické oxidanty řadíme vitamín C, vitamín E, karotenoidy a thiolové antioxidanty.

Závěrem Khan et al. (2011) ve své studii uvádí, že nízká plodnost nebo neplodnost u drůbeže má souvislost s ROS, i když se nejedná o jedinou příčinu. Jelikož antioxidanty mohou ovlivňovat výskyt ROS v organismu, mohou tak ovlivnit míru plodnost u drůbeže. Je tedy důležité vliv antioxidantů u drůbeže nadále sledovat.

### 3.9 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (FC) je sofistikovaná technologie, která pracuje na principu rozptylu světla a laserové technologie. Historicky první vyvinutá FC byla jednoparametrový přístroj detekující pouze velikost buněk. V současné době má FC schopnost detekovat až 14 parametrů současně (Wilkerson 2012).

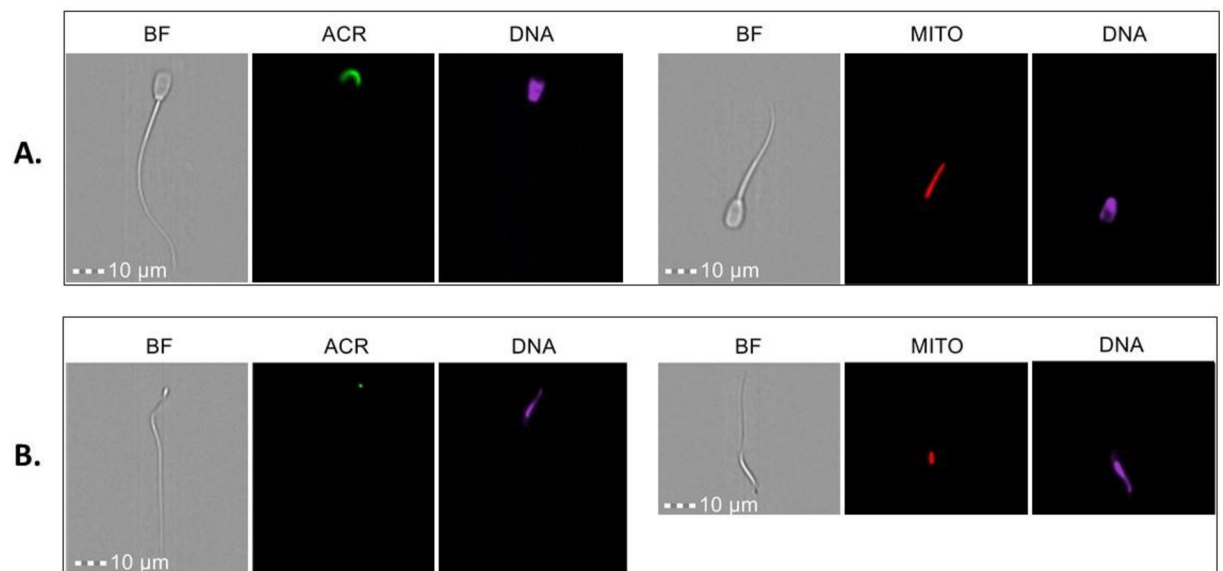
Výhodou FC je schopnost měřit optické a fluorescenční charakteristiky jedné buňky nebo jakékoliv jiné částice, jako jsou například jádra a chromozomové preparáty v proudu tekutiny. Rozptyl světla přímo souvisí se strukturními a morfologickými vlastnostmi buněk. Hlavním principem FC je třídění buněk do jednotlivých populací, které se používají pro následné analýzy dle druhu experimentu. FC analyzuje množství dat, včetně multiparametrické analýzy buněčných populací na úrovni jedné buňky. Kromě toho také umožňuje fyzické třídění buněk na základě vybraných parametrů za velmi krátký čas. Díky této technologii jsme schopni analyzovat reprezentativní vzorky spermatu s ohledem na celkový ejakulát (Wilkerson 2012; Adan et al. 2017).

Průtokový cytometr obsahuje fluidiku, optiku, elektroniku (detektory) a interpretaci (zpracování dat pomocí softwaru). Detektory, které jsou součástí průtokové cytometrie jsou schopny měřit přímý rozptyl (forward scatter, FSC) – přímo úměrný velikosti buňky (živé x mrtvé buňky) a boční rozptyl (side scatter, SSC) – přímo úměrný granularitě buňky (McKinnon 2018). Získaná data z měření poskytují cenné informace o biochemických, biofyzikálních a molekulárních částicích. Analyzují specifické rysy spermií, jako jsou:



životaschopnost, akrozomální stav, membránový mitochondriální potenciál, produkce ROS, popř. změny v DNA (Svoradová et al. 2021). Průtokovou cytometrii lze využít i k detekci nespermatických částic ejakulátu. K vyhodnocování zmíněných parametrů jsou využívána fluorescenční barviva. Mezi fluorescenční barviva patří Hoechst 33342, Propidium Iodine, PNA lecitin, Mitotracker Deep Red, CellRox Deep Red®, Yo-Pro1 atd. Yo-Pro 1 se používá pro identifikaci poškozených a nepoškozených spermií. Membrána poškozených buněk je prostupná pro toto fluorescenční barvivo naopak membrána nepoškozených buněk zůstává nepropustná. Na podobném principu pracuje i SYBR-14, který je široce používaný k určení podílu živých/mrtvých buněk. Dalším parametrem kvality spermií je mitochondriální potenciál (Svoradová et al. 2021).

Hlavní výhodou fluorescenčního barviva Hoechst 33342 je schopnost obarvení DNA (viz Obrázek 5), díky obsaženému fluoru, který obarvuje nukleovou kyselinu. Obarvením nukleové kyseliny je prováděna sexace spermií na subpopulace Z (samci) a W (samice).



Obrázek 5: Spermie obarveny pomocí PNA-lektinu/FITC (akrozom, ACR), Hoechst-33342 (DNA) nebo Mitotracker Deep Red (mitochondrie, MITO), A–rozmrážené býčí spermie, B – zmražené/rozmrážené spermie kohouta. BF–neobarvené spermie (Janošíková et al. 2022)

Další uvedené fluorescenční barvivo je Propidium Iodine, které má schopnost obarvovat buňky s poškozenou plazmatickou membránou.

PNA lecitin detekuje buňky s poškozeným akrozomem, Mitotracker Deep Red detekuje mitochondriální aktivitu (Nikolova et al. 2013; Lançonni et al. 2017).

Mitochondriální funkce může být hodnocena různými fluorescenčními barvivy, jako je Rhodamin 123 nebo JC-1. Nevýhodou Rhodaminu 123 je jeho schopnost identifikovat zároveň viabilní a poškozené buňky (Svoradová et al. 2021).

Novinkou v oboru andrologie je CellRox Deep Red® (viz Příloha IV) testován na ovčích spermiích (Lançonni et al. 2017). Fluorescenčního barvivo CellRox hodnotí hladinu oxidativního stresu v buňkách. Je schopen detekovat hydroxylový radikál a superoxidový anion.

V případech, kdy není v buňce detekován nebo je detekován jen minimálně, jsou fluorescenční signály velmi nízké.

### 3.10 Počítačem asistovaná analýza spermií CASA

Počítačem asistovaná analýza spermií (CASA) zajišťuje přesné a rychlé vyhodnocení parametrů spermatu (viz Obrázek 6). Jsou hodnoceny: celková a progresivní motilita, vzorce pohybu spermií, linearita, příčná frekvence, amplituda bočního posunutí hlavičky a několik rychlostních parametrů (Svoradová et al. 2021).



Obrázek 6: Přední a boční projekce CASA (dostupné z [www.isperm.co](http://www.isperm.co))

Značná výhoda CASA je její relativní přesnost a okamžité vyhodnocení parametrů vzorku (Elsayed et al. 2015). CASA využívá pouze jeden mikroskop, který lze manuálně zaostřit. Pomocí mikroskopu, který je opatřen speciálním širokopásmovým osvětlením viditelného spektra, je digitalizován a vizualizován snímek ejakulátu. Pomocí tzv. centroidu je sledována trajektorie spermií a díky speciálnímu algoritmu je možné odlišit spermie, u kterých při měření dochází ke křížení a srážení (Elsayed et al. 2015).

## 4 Metodika

### 4.1 Zvířata zařazená do experimentu

Do experimentu byli zařazeni kohouti plemene Česká zlatá kropenatá (n=4). Toto plemeno je zařazeno do genových zdrojů. Kohouti byli po celou dobu pokusu chováni v oddělených klecích ve stáji o teplotě 20 °C. V průběhu experimentu byli krmeni KKS (Sehnoutek a synové s.r.o.) vyrobenou pro ČZU (složení viz Příloha V), vodu byla dostupná ad libitně. Průměrný věk kohoutů byl 68 měsíců.

### 4.2 Odběr a zpracování ejakulátu

V prováděném pokusu byly vzorky ejakulátu kohoutů odebírány dle harmonogramu odběru spermatu s celkovým počtem devíti odběrů (viz Tabulka 1). Kohoutí ejakulát byl odebírán dvakrát týdně, metodou dorzo-abdominální masáže. Odebraný ejakulát byl uskladněn při teplotě 5 °C až do zpracování. Odběr prováděla vždy stejná osoba za stejných podmínek stájového prostředí vždy v 8 hodin ráno.

*Tabulka 1: Harmonogram odběru*

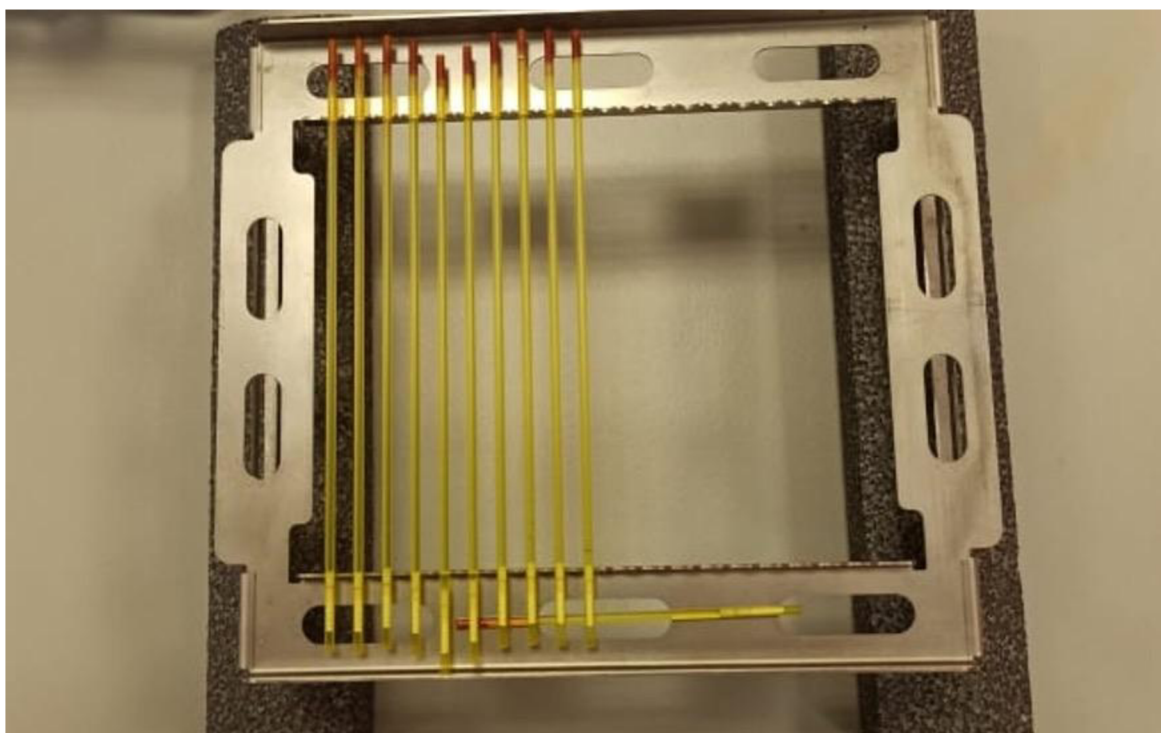
Harmonogram odběru spermatu	
Odběr č.	Datum
1	10.1. 2022
2	14.1. 2022
3	17.1.2022
4	20.1. 2022
5	24.1. 2022
6	27.1. 2022
7	31.1. 2022
8	10.2. 2022
9	22.2.2022

Analýza probíhala v reprodukčních laboratořích Katedry chovu hospodářských zvířat FAPPZ B. Pro analýzu byly použity pouze ejakuláty bez příměsi trusu. Byl vytvořen směsný vzorek a stanovený objem. Celkový objem byl naředěn v poměru 1:15 na finální koncentraci  $\pm 100 \times 10^6$  spermií na 1 ml komerčními ředidly Raptac, NeXcell a Poultry media a ekvilibrován po dobu 30 minut při teplotě 5 °C. Před přidáním kryoprotektantu bylo od každého typu ředidla odebráno 10  $\mu$ l naředěného ejakulátu a provedena analýza koncentrace a motility pomocí CASA (iSperm, Aidmics Biotechnology Co., Ltd., Taipei, Taiwan). Následně byla ke všem uvedeným ředidlům přidána stejná kryoprotektantní složka

NMA v koncentraci 9 %. Veškeré komponenty používané pro přípravu byly vychlazeny na 5 °C.

### 4.3 Příprava inseminačních dávek, mražení

Takto připravený naředěný ejakulát byl plněn do pejet o objemu 0,25 ml. Pejety byly uzavřeny pomocí těsnícího prášku. Uzavřené pejety (viz Obrázek 7) byly umístěny na plovoucí rack a chlazený v parách tekutého dusíku (5 cm) po dobu 10 minut. Zchlazené pejety byly následně ponořeny do tekutého dusíku o teplotě -196 °C po dobu 10 minut. Zamražené pejety byly až do analýzy uloženy v kryotanku (CD cryo diffusion, France).



Obrázek 7: Pejety s inseminační dávkou umístěné na racku (foto autor)

### 4.4 Hodnocení inseminačních dávek pomocí průtokové cytometrie

Bezprostředně před hodnocením byly pejety rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 5 °C po dobu 100 s. Po rozmražení pejet byla pomocí CASA analýzy sledována koncentrace a motilita. Pakliže rozmražená ID splňovala požadované parametry na ID, byla podrobena další analýze pomocí průtokové cytometrie (viz Obrázek 8) (Novocyte 3000, Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, Californie, USA).

Pro hodnocení v FC byly připraveny platy. Byly hodnoceny 3 jamky pro každou z variant (ředidlo + kryoprotektant) (viz Obrázek 9).

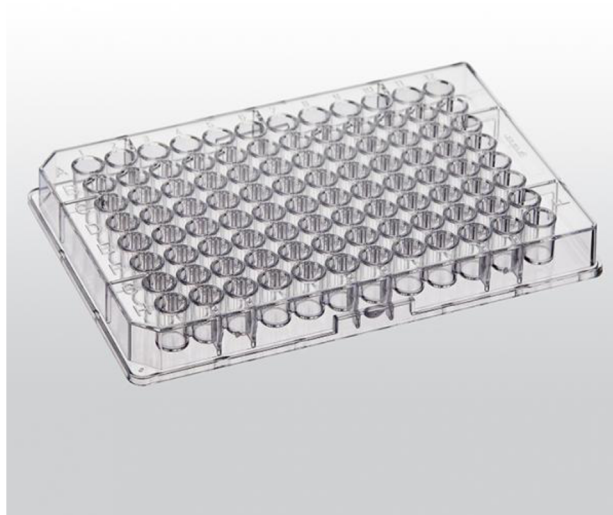
Pro přípravu každé z jamek bylo použito 100 µl PBS (fosfátový pufr), 10 µl master mixu (mix námi zvolených fluorescenčních barviv) a 10 µl rozmražené ID. Master mix byl složen z fluorescenčních barviv Hoechst 33342 pro identifikaci přítomnosti DNA, Propidium Iodine

pro detekci poškození plazmatické membrány, PNA lecitin pro identifikaci stavu akrozomu, CellRox Deep Red® pro detekci oxidativního stresu a PBS. Oxidativní stres nebyl statisticky hodnocen. Po přidání fluorescenčních barviv, byl plate ekvilibrován při teplotě 38,5 °C po dobu 15 minut.

Takto připravený plate, byl umístěn do FC. Sledovány byly výsledky podílu viabilních buněk (PMI), buněk s poškozenou plazmatickou membránou (PMD), buněk s poškozeným akrozomem (ACRD) a buněk s dvojitým poškozením (PAD) z celkového počtu spermatických buněk pomocí softwaru Novocyte.



Obrázek 8: Průtokový cytometr NovoCyte (foto autor)



Obrázek 9: 96 jamkový plate na FC (dostupné z <https://eu.systemex-flowcytometry.com/consumables/sample-tubes-and-accessories/2948/96-well-plates>)

## 5 Statistická analýza dat

Veškerá statistická vyhodnocení probíhala ve statistickém programu SAS (SAS/STAT, 2013). Následná analýza variance byla provedena za použití generalized linear model procedury. Jako závislé proměnné byly vyhodnocovány jednotlivé parametry průtokové cytometrie (celková viabilita buněk, podíl buněk s poškozenou cytoplazmatickou membránou, podíl buněk s poškozením akrozomu, a dále podíl buněk s poškozením akrozomu i cytoplazmatické membrány).

Statistické modely pro vyhodnocení parametrů průtokové cytometrie po ekvilibraci hodnocené v definovaném časovém intervalu uvedeny níže:

$$1) \text{VIAeq}_{ijkl} = \mu + \text{DEN}_i + \text{EX}_j + \text{TEMP}_k + \text{EX} * \text{TEMP}_{jk} + e_{ijkl}$$

$$2) \text{PMeq}_{ijkl} = \mu + \text{DEN}_i + \text{EX}_j + \text{TEMP}_k + \text{EX} * \text{TEMP}_{jk} + e_{ijkl}$$

$$3) \text{ACReq}_{ijkl} = \mu + \text{DEN}_i + \text{EX}_j + \text{TEMP}_k + \text{EX} * \text{TEMP}_{jk} + e_{ijkl}$$

$$4) \text{PMACReq}_{ijkl} = \mu + \text{DEN}_i + \text{EX}_j + \text{TEMP}_k + \text{EX} * \text{TEMP}_{jk} + e_{ijkl}$$

kde  $\text{VIAeq}_{ijk}$  = celková viabilita buněk po ekvilibraci,  $\text{PMeq}_{ijk}$  = podíl buněk s poškozenou cytoplazmatickou membránou po ekvilibraci,  $\text{ACReq}_{ijk}$  = podíl buněk s poškozením akrozomu po ekvilibraci,  $\text{PMACReq}_{ijk}$  = podíl buněk s poškozením akrozomu i cytoplazmatické membrány;  $\text{DEN}_i$  = fixní efekt  $i$ -tého odběrového dne ( $i = 1$ . odběrový den,  $n=9$ ;  $i = 2$ . odběrový den,  $n = 17$ ;  $i = 3$ . odběrový den,  $n = 12$ ;  $i = 4$ . odběrový den,  $n = 18$ ;  $i = 5$ . odběrový den,  $n = 18$ ;  $i = 6$ . odběrový den,  $n=9$ ;  $i = 7$ . odběrový den,  $n = 18$ ;  $i = 8$ . odběrový den,  $n=18$ ;  $i = 9$ . odběrový den,  $n = 5$ );  $\text{EX}_j$  = fixní efekt přídatku  $j$ -tého ředidla ( $j =$  přídatek ředidla Poultry media,  $n = 38$ ;  $j =$  přídatek ředidla Raptac,  $n = 44$ ;  $j =$  přídatek ředidla NeXcell,  $n = 42$ );  $\text{TEMP}_k$  = fixní efekt  $k$ -té teploty ekvilibrace po rozmražení ( $k =$  varianta ekvilibrace při teplotě  $5^\circ\text{C}$ ,  $n = 58$ ;  $k =$  varianta ekvilibrace při teplotě  $40^\circ\text{C}$ ,  $n = 68$ ).  $\text{EX} * \text{TEMP}_{ijk}$  = interakce variant přídatku ředidel a teploty ekvilibrace po rozmražení;  $e_{ijkl}$  = residuální chyba.

Statistické rozdíly mezi odhadnutými průměry byly detekovány na hladině významnosti  $P < 0,05$ .

## 6 Výsledky

### 6.1 Výsledky CASA

V tabulce 2 jsou uvedeny základní statistické charakteristiky pro celkovou motilitu. Byly hodnoceny vzorky odebrané v 9 různých odběrových dnech. Hodnoty celkové motility byly měřeny před mražením a 30 minut po rozmražení. Z výsledků je zřejmé, že došlo k výraznému poklesu celkové motility a to na hodnotu  $15,87 \% \pm 17,07$  během procesu kryokonzervace.

*Tabulka 2: Základní statistické charakteristiky – CASA (MOTBFR-motilita spermií před mražením, MOTTHW-motilita po rozmražení, SEM-směrodatná odchylka)*

Ukazatel	Četnost	Průměr (%)± SEM	Min (%)	Max (%)
MOTBFR	124	52,06 ± 15,27	17,00	84,00
MOTTHW	124	15,87 ± 17,07	0,00	68,00

V tabulce 3 je uveden vliv použitého ředidla na celkovou motilitu. Ředidla Poultry Media a Raptac se statisticky nelišila. Oproti Poultry Media a Raptacu se NeXcell statisticky lišil hodnotou  $2,79 \% \pm 1,41$ .

*Tabulka 3: Vliv použitého ředidla na celkovou motilitu po rozmražení (PMITHW-životaschopnost spermií po rozmražení, LSM-metoda nejmenších čtverců, SEM-směrodatná odchylka, odlišná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ))*

Typ ředidla	PMITHW LSM % ± SEM
Poultry Media	23,07 ± 1,50 <sup>a</sup>
Raptac	21,34 ± 1,34 <sup>a</sup>
NeXcell	2,79 ± 1,41 <sup>b</sup>

## 6.2 Výsledky průtokové cytometrie

### 6.2.1 Základní charakteristiky – průtoková cytometrie

Tabulka 4 znázorňuje procentuální zastoupení životaschopných spermií (oplozeníšchopných) v rámci hodnocených parametrů: životaschopnost, poškození plazmatické membrány, poškození akrozomu. Vzorokly byly hodnoceny u 12 vzorků po ekvilibraci a u 124 vzorků 30 minut po rozmražení. Průměrná hodnota životaschopných spermií v inseminační dávce po ekvilibraci byla 72,72 % ± 7,25. Průměrná hodnota poškození cytoplazmatické membrány po ekvilibraci dosahovala hodnot 16,67 % ± 7,41. Akrozomální poškození po ekvilibraci dosáhla hodnoty 8,94 % ± 8,47. U poškození akrozomu a cytoplazmatické membrány dosahovalo nejnižších hodnot 1,67 % ± 1,83. Po rozmražení byl zaznamenán značný pokles počtu životaschopných spermií na hodnotu 35,55 % ± 22,40. V případě míry cytoplazmatické membrány po rozmražení došlo k výraznému navýšení hodnot poškození, a to téměř čtyřnásobně na 60,80 % ± 22,40, znázorněno (viz Graf 1).

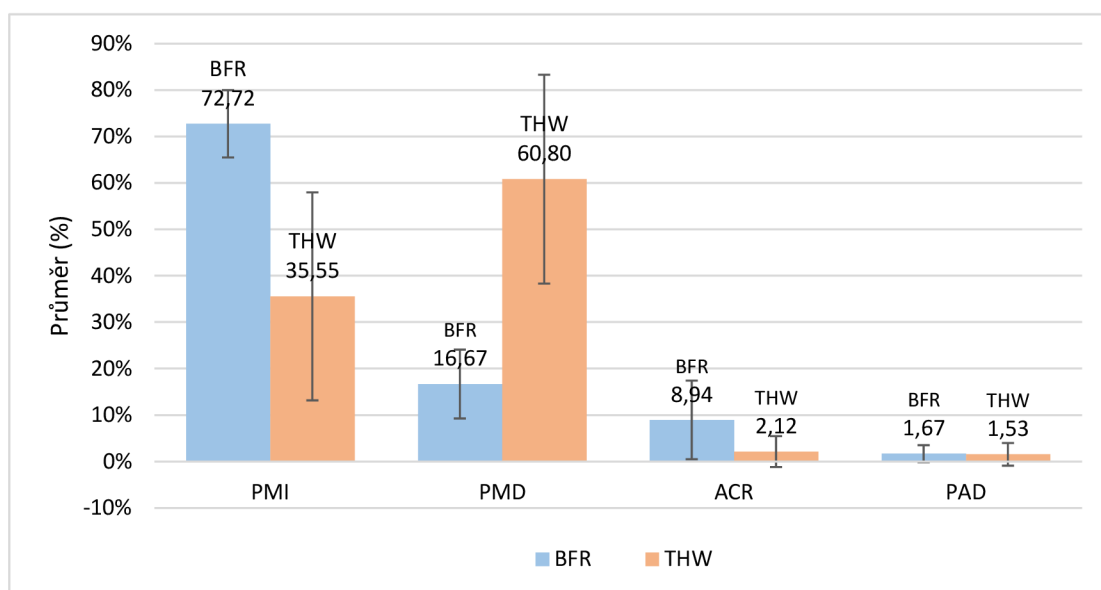
U poškození akrozomu po rozmražení došlo k poklesu na 2,12 % ± 3,32. U poškození akrozomu a cytoplazmatické membrány po rozmražení nedošlo k výrazným změnám, dosahovaly podobných hodnot 1,51 % ± 2,44.

*Tabulka 4: Základní statistické charakteristiky FC (PMIBFR–životaschopnost spermií před mražením; PMDBFR–poškození cytoplazmatické membrány před mražením; ACRDBFR–poškození akrozomu před mražením; PADBFR–poškození akrozomu a cytoplazmatické membrány před mražením; PMITHW–životaschopnost spermií po rozmražení; PMDTHW–poškození plazmatické membrány po rozmražení; ACRDTHW–poškození akrozomu po rozmražení; PADTHW–poškození akrozomu a cytoplazmatické membrány po rozmražení, SEM-směrodatná odchylka)*

Ukazatel	Četnost	Průměr (%)± SEM	Min (%)	Max (%)
PMIBFR	12	72,72 ± 7,25	64,37	83,50
PMDBFR	12	16,67 ± 7,41	6,76	28,02
ACRDBFR	12	8,94 ± 8,47	1,97	24,96
PADBFR	12	1,67 ± 1,83	0,44	5,55
PMITHW	124	35,55 ± 22,40	0,63	59,03
PMDTHW	124	60,80 ± 22,50	27,50	98,06
ACRDTHW	124	2,12 ± 3,32	0,00	13,01
PADTHW	124	1,53 ± 2,44	0,09	12,03



Graf 1: Průměrné hodnoty pozorovaných parametrů spermií–FC (PMI–životaschopnost spermií; PMD–poškození cytoplazmatické membrány; ACRD–poškození akrozomu; PAD–poškození akrozomu a plazmatické membrány, BFR–před mražením, THW–po rozmražení)



## 6.2.2 Procentuální zastoupení viabilních spermií po rozmražení

### 6.2.2.1 Popis modelu

Proměnlivost ukazatele byla prokázána z 97,88 % ( $P < 0,0001$ ). V modelové rovnici byl statisticky průkazný vliv sledovaných faktorů: vliv odběrového dne ( $P < 0,0001$ ) a vliv přídatku zvoleného ředidla ( $P < 0,0001$ ). Statisticky průkazný vliv nebyl prokázán u sledovaných parametrů: teplota ekvibrace po rozmražení, interakce variant přídatku zvoleného ředidla a teploty ekvibrace. Níže jsou uvedeny fixní vlivy odběrového dne a použité metody mražení.

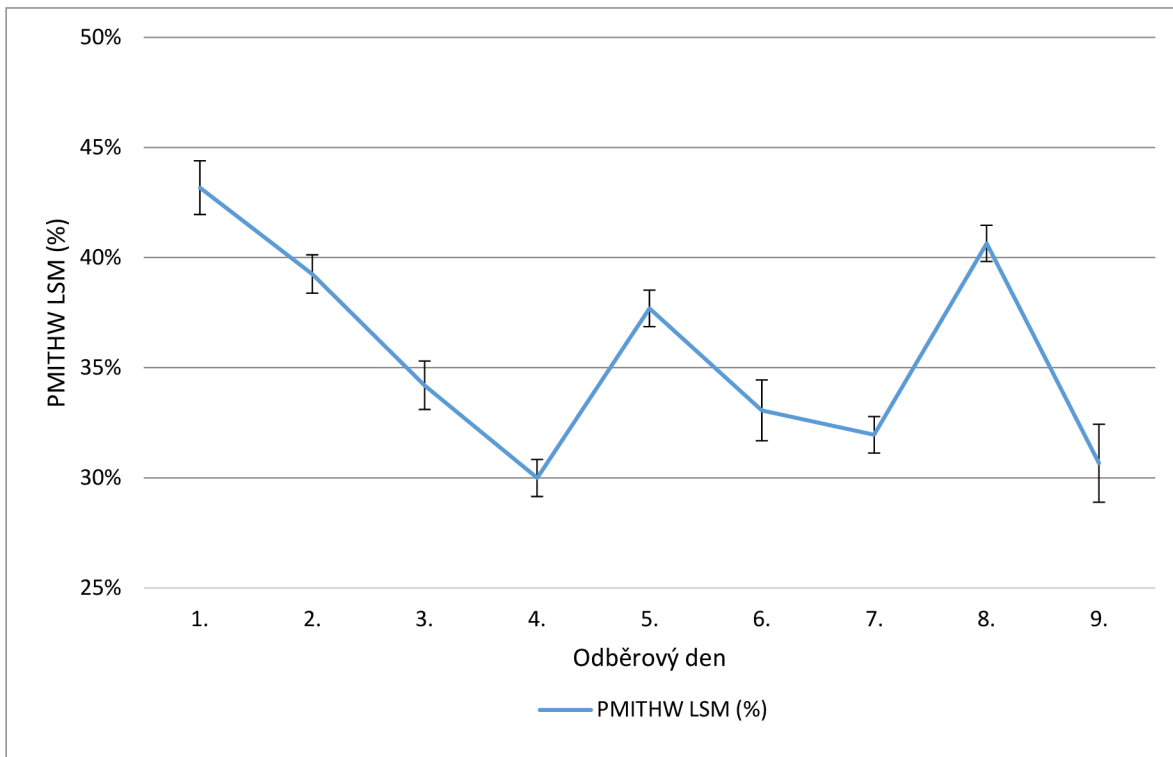
### 6.2.2.2 Vliv odběrového dne na viabilitu spermií po rozmražení

V rámci jednotlivých odběrových dnů byly zjištěny statisticky signifikantní rozdíly u vzorků hodnocených po 30 minutách po rozmražení (viz Graf 2). Nejvyšší viabilita byla zaznamenána u vzorku z 1. odběrového dne, který dosahoval hodnot  $43,17\% \pm 1,21$ . Výsledky nebyly statisticky prokazatelně lepší ve srovnání s 2. a 8. odběrovým dnem. Nejhorších hodnot nabýval 4. odběrový den, kdy hodnota dosahovala  $29,99\% \pm 0,84$  (viz Tabulka 5) ale nebyl statisticky signifikantně horší než 3., 6., 7. a 9. odběrový den.

Tabulka 5: Vliv odběrového dne na viabilitu spermií po rozmražení (PMITHW-životaschopnost spermií po rozmražení, LSM-metoda nejmenších čtverců, SEM-směrodatná odchylka)

Odběrový den	PMITHW LSM (%)± SEM	P<0,05
1.	43,17 ± 1,22	1:3-7,9
2.	39,25 ± 0,87	2: 3-4,6-7,9
3.	34,20 ± 1,10	3:1-2,8
4.	29,99 ± 0,84	4:1-2,5,8
5.	37,69 ± 0,83	5:1,4,7,9
6.	33,06 ± 1,38	6:1-2,8
7.	31,95 ± 0,83	7:1-2,5,8
8.	40,64 ± 0,82	8:3-4,6,7,9
9.	30,66 ± 1,77	9:1-2,58

Graf 2: Vliv odběrového dne na viabilitu spermií po rozmražení (PMITHW- Životaschopnost spermií po rozmražení; LSM-metoda nejmenších čtverců)



### 6.2.2.3 Vliv použitého ředidla na viabilitu spermií po rozmražení

Tabulka 6 udává hodnoty viability buněk po rozmražení u různých ředidel. Nejlepší hodnoty byly zjištěny při použití ředidla Poultry media. Výsledky nebyly statisticky prokazatelně lepší ve srovnání s ředidlem Raptac. Oproti tomu statisticky významný rozdíl byl prokázán při použití ředidla NeXcell s hodnotou  $5,04 \% \pm 0,57$ .

*Tabulka 6: Vliv zvoleného ředidla (PMITHW-životaschopnost spermií po rozmražení; LSM-metoda nejmenších čtverců, SEM-směrodatná odchylka, odlišná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ))*

Typ Ředidla	PMITHW LSM % $\pm$ SEM
Poultry Media	$51,02 \pm 0,60^a$
Raptac	$50,80 \pm 0,54^a$
NeXcell	$5,04 \pm 0,57^b$

### 6.2.2.4 Vliv teploty ekvibrace po rozmražení

Tabulka 7 znázorňuje vliv rozdílné teploty ( $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ekvibrace po rozmražení na funkční parametry spermií. K poškození cytoplazmatické membrány docházelo při obou zvolených teplotách ekvibrace. Při teplotě  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  byly pozorovány hodnoty, které se od sebe vzájemně statisticky významně nelišily, a to u všech sledovaných funkčních parametrech spermií.

*Tabulka 7: Vliv teploty ekvibrace po rozmražení (PMITHW-životaschopnost spermií po rozmražení; PMDTHW-poškození plazmatické membrány po rozmražení; ACRDTHW-poškození akrozomu po rozmražení; PADTHW-poškození akrozomu a plazmatické membrány po rozmražení; LSM-metoda nejmenších čtverců, SEM-směrodatná odchylka, a-nebyly statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ))*

Teplota	PMITHW LSM (%) $\pm$ SEM	PMDTHW LSM (%) $\pm$ SEM	ACRDTHW LSM (%) $\pm$ SEM	PADTHW LSM (%) $\pm$ SEM
$5\text{ }^{\circ}\text{C}$	$35,76 \pm 0,54^a$	$60,42a \pm 0,58^a$	$1,96 \pm 0,11^a$	$1,86 \pm 0,14^a$
$40\text{ }^{\circ}\text{C}$	$35,49 \pm 0,46^a$	$60,58a \pm 0,49^a$	$2,13 \pm 0,09^a$	$1,81 \pm 0,12^a$

### 6.2.3 Procentuální zastoupení spermií s poškozenou cytoplazmatickou membránou, poškozeným akrozomem a poškození akrozomu a cytoplazmatické membrány

#### 6.2.3.1 Popis modelu

Použitý model vysvětloval proměnlivost ukazatele poškození cytoplazmatické membrány z 97,59 % a byl průkazný ( $P < 0,0001$ ). V modelové rovnici byl statisticky průkazný vliv následujících sledovaných faktorů: vliv odběrového dne ( $P < 0,0001$ ) a vliv přídatku zvoleného ředidla ( $P < 0,0001$ ). Teplota ekvibrace po rozmražení, interakce variant přídatku zvoleného ředidla a teploty ekvibrace neměly statisticky průkazný vliv. Níže jsou uvedeny fixní vlivy odběrového dne a použité metody mražení. Proměnlivost ukazatele poškození akrozomu byla vysvětlena z 96,06 % a byl statisticky průkazný ( $P < 0,0001$ ). V modelové rovnici byl statisticky průkazný vliv odběrového dne ( $P < 0,0001$ ). Použitý model dále vysvětloval proměnlivost ukazatele poškození cytoplazmatické membrány a akrozomu z 88,10 % a byl průkazný ( $P < 0,0001$ ). Vliv odběrového dne, byl statisticky průkazný v modelové rovnici ( $P < 0,0001$ ).

#### 6.2.3.2 Vliv odběrového dne na poškození cytoplazmatické membrány

V tabulce 8 nalezneme vliv odběrového dne na poškození cytoplazmatické membrány. Nejvyšší procentuální zastoupení buněk s poškozenou membránou bylo naměřeno 7. odběrový den ( $66,23 \% \pm 0,89$ ). Tento výsledek se statisticky významně nelišil od 3., 6., 9., odběrového dne. Naopak nejmenší poškození cytoplazmatické membrány bylo zjištěno 1. odběrový den ( $44,72 \% \pm 1,31$ ), který se statisticky významně lišil od ostatních odběrových dnů.

*Tabulka 8: Vliv odběrového dne na poškození cytoplazmatické membrány po rozmražení (PMDTHW-poškození cytoplazmatické membrány, LSM-metoda nejmenších čtverců)*

Odběrový den	PMDTHW LSM (%)	P < 0,05
1 (n=9)	44,72 ± 1,31	1: 2-9
2 (n=17)	58,32 ± 0,93	2: 1,3,6,7,9
3 (n=12)	65,56 ± 1,18	3: 1,2,4,8
4 (n=18)	59,01 ± 0,90	4: 1,3,6,7
5 (n=18)	61,73 ± 0,89	5: 2
6 (n=9)	65,8 ± 1,48	6:1,2,4,8
7 (n=18)	66,23 ± 0,89	7:1,2,4,5,8
8 (n=18)	57,8 ± 0,88	8: 1,3,6,7,9
9 (n=5)	65,33 ± 1,90	9: 1,2,8

Nejvyšší procentuální zastoupení buněk s akrozomálním poškozením bylo zaznamenáno 4. odběrový den (viz Tabulka 9), který se významně lišil od ostatních odběrových dnů. Výrazně nejmenší poškození akrozomu bylo zjištěno 3. odběrový den (0,02

% ± 0,22). Výsledek nebyl statisticky prokazatelně lepší ve srovnání se získanými hodnotami v 5., 6., a 7. odběrovém dni.

*Tabulka 9: Vliv teploty na akrozomální poškození spermií po rozmražení (ACRDTHW-poškození akrozomu po rozmražení, LSM-metoda nejmenších čtverců)*

Odběrový den	ACRDTHW LSM (%)	P < 0,05
1 (n=9)	2,77 ± 0,25	1:2-8
2 (n=17)	1,08 ± 0,18	2:1,3,4,5,7,9
3 (n=12)	0,02 ± 0,22	3: 1,2,4,8,9
4 (n=18)	9,79 ± 0,17	4:1-3,5-9
5 (n=18)	0,27 ± 0,17	5: 1,2,4,9
6 (n=9)	0,63 ± 0,28	6: 1,4,9
7 (n=18)	0,27 ± 0,17	7: 1,2,4,9
8 (n=18)	0,88 ± 0,17	8:1,3,4,9
9 (n=5)	2,73 ± 0,36	9: 2-8

Tabulka 10 znázorňuje nejvyšší procentuální zastoupení spermatických buněk s poškozenou cytoplazmatickou membránou i akrozomem, které bylo naměřeno v 1. odběrovém dni (9,34 % ± 0,32). Hodnoty naměřené v ostatních odběrových dnech se statisticky významně lišily. Naopak nejmenší poškození bylo naměřeno ve 3. odběrovém dni (0,26 % ± 0,28). Ve srovnání s výsledky ostatních odběrových dní, se hodnoty statisticky významně nelišily u 4., 5., 6., 8., a 9. odběrového dne.

*Tabulka 10: Vliv teploty na poškození plazmatické membrány i akrozomu spermií po rozmražení (PADTHW-poškození akrozomu a cytoplazmatické membrány)*

Odběrový den	PADTHW LSM (%)	P < 0,05
1 (n=9)	9,34 ± 0,32	1:2-9
2 (n=17)	1,36 ± 0,22	2: 1, 5
3 (n=12)	0,26 ± 0,28	3: 1,7
4 (n=18)	1,21 ± 0,22	4: 1
5 (n=18)	0,32 ± 0,21	5: 1,2,7
6 (n=9)	0,5 ± 0,36	6: 1
7 (n=18)	1,54 ± 0,21	7: 1,3, 5
8 (n=18)	0,67 ± 0,21	8: 1
9 (n=5)	1,29 ± 0,46	9: 1

### 6.2.3.3 Vliv zvoleného ředidla na poškození cytoplazmatické membrány

Tabulka 11 udává procentuální zastoupení buněk s poškozením cytoplazmatické membrány vlivem zvoleného ředidla a teploty. Nejvyšší hodnoty poškození cytoplazmatických membrán po rozmražení byly zjištěny u ředidla NeXcell, a to jak při teplotě ekvilibrace 5 °C, tak i 40 °C. Jedná se o signifikantně statisticky prokazatelný rozdíl ve srovnání s ostatními ředidly. Dosahovaly enormních hodnot poškození (5 °C 90,49 %; 40 °C 91,22 %). Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi teplotami ekvilibrace.

*Tabulka 11: Vliv zvoleného ředidla na poškození cytoplazmatické membrány spermíí po rozmražení (odlišná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky signifikantní nebo statistické rozdíly ( $P < 0,05$ ) při teplotách ekvilibrace 5 °C a 40 °C*

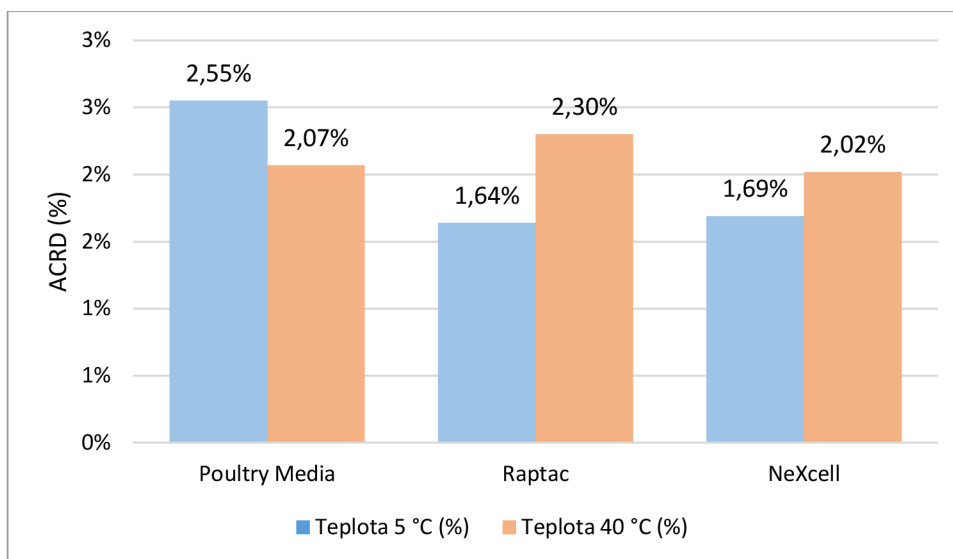
Typ Ředidla	Teplota 5 °C (%)	Teplota 40 °C (%)
Poultry Media	44,18 <sup>a</sup>	45,97 <sup>a</sup>
Raptac	46,59 <sup>a</sup>	44,55 <sup>a</sup>
NeXcell	90,49 <sup>b</sup>	91,22 <sup>b</sup>

Tabulka 12 udává procentuální zastoupení buněk s akrozomálním poškozením vlivem zvoleného ředidla a teploty. Nejvyšší hodnoty poškození byly zjištěny při použití ředidla Poultry media (viz Graf 3), které se statisticky prokazatelně nelišilo ve srovnání se ostatními použitými ředidly. U zvolených teplot ekvilibrace po rozmražení byl prokázán nízký vliv na poškození akrozomu. Zároveň nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými teplotami ekvilibrace.

*Tabulka 12: Vliv zvoleného ředidla a teploty ekvilibrace na akrozomálním poškození spermíí na rozmražení při teplotách ekvilibrace 5 °C a 40 °C (a-nebyly statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ))*

Typ Ředidla	Teplota 5 °C	Teplota 40 °C
Poultry Media	2,55% <sup>a</sup>	2,07 <sup>a</sup>
Raptac	1,64% <sup>a</sup>	2,30 <sup>a</sup>
NeXcell	1,69% <sup>a</sup>	2,02 <sup>a</sup>

Graf 3: Vliv zvoleného ředidla na akrozomální poškození spermií po rozmražení při teplotách ekvilibrace 5 °C a 40 °C (ACRD-Akrozomální poškození)

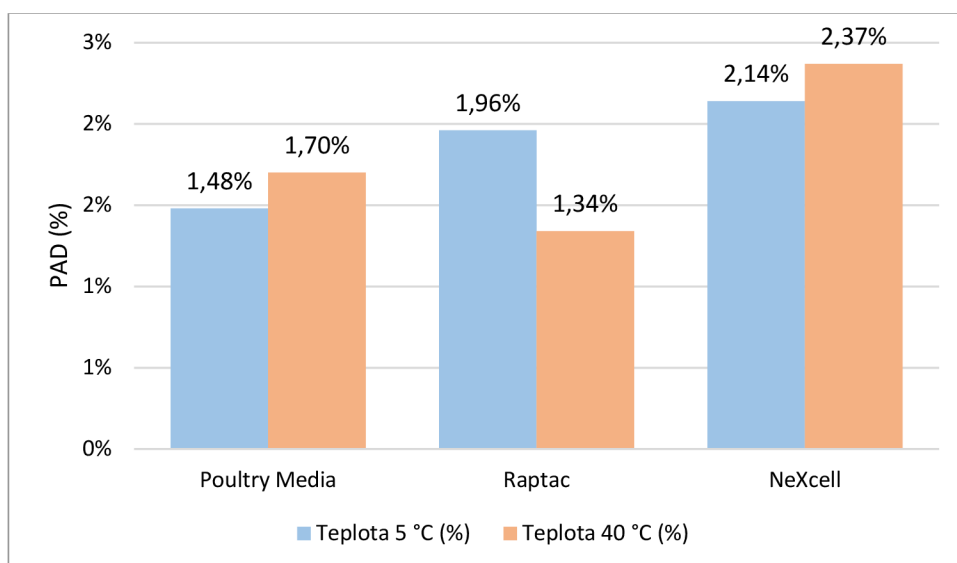


Tabulka 13 udává procentuální zastoupení buněk s poškozením akrozomu a cytoplazmatické membrány vlivem zvoleného ředidla a teploty. Nejvyšší hodnoty poškození byly zjištěny při použití ředidla NexCell, které se statisticky prokazatelně nelišilo ve srovnání s ostatními použitými ředidly. U obou zvolených teplot ekvilibrace po rozmražení byl prokázán nízký vliv na poškození akrozomu a cytoplazmatické membrány. Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi teplotami ekvilibrace. Graf 4 znázorňuje shrnutí a vizualizaci sledovaných parametrů.

Tabulka 13: Vliv zvoleného ředidla na poškození akrozomu a cytoplazmatické membrány spermií po rozmražení (a-nebyly statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ))

Typ ředidla	Teplota 5 °C (%)	Teplota 40 °C (%)
Poultry Media	1,48 <sup>a</sup>	1,70 <sup>a</sup>
Raptac	1,96 <sup>a</sup>	1,34 <sup>a</sup>
NeXcell	2,14 <sup>a</sup>	2,37 <sup>a</sup>

Graf 4: Vliv zvoleného ředidla na poškození akrozomu a cytoplazmatické membrány



Tabulka 14 ukazuje vliv teploty na poškození spermií po rozmražení. Byly porovnávány jednotlivé funkční parametry u rozdílných teplot ekvilibrace. Mezi jednotlivými funkčními parametry nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly a to žádného z pozorovaných parametrů.

Tabulka 14: Vliv teploty ekvilibrace na funkční parametry spermií po rozmražení (PMDTHW-poškození cytoplazmatické membrány po rozmražení, ACRDTHW-poškození akrozomu po rozmražení, PADTHW-poškození akrozomu a cytoplazmatické membrány po rozmražení, LSM-metoda nejmenších čtverců, SEM-směrodatná odchylka, a-nebyly statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ))

Teplota	PMDTHW LSM (%) $\pm$ SEM	ACRDTHW LSM (%) $\pm$ SEM	PADTHW LSM (%) $\pm$ SEM
5 °C	60,42 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	1,96 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	1,86 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>
40 °C	60,58 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	2,13 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	1,80 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>



## 7 Diskuse

Česká slepice zlatá kropenatá je plemeno, které se chová na území České republiky již po staletí. Počátkem 20. století získalo plemeno současnou podobu, a roku 1922 bylo zapsáno na Seznam genových zdrojů ČR. V současné době je Česká slepice zlatá kropenatá zařazena mezi genově ohrožené druhy, a to z několika důvodů. Jedná se například o import nových plemen do ČR a s tím související snaha o zachování genetického zdroje nebo o výskyt pandemie ptačí chřipky. V roce 2020 bylo evidováno pouze 259 kusů tohoto plamene na území ČR (VÚŽV 2022).

Mražení spermatu představuje hlavní nástroj pro zachování genetických zdrojů. Kryokonzervace ptačího spermatu je velmi problematická, a proto je nezbytné tento proces optimalizovat. Jedním z aspektů, který ztěžuje proces kryokonzervace ptačích spermií je odlišná morfologie pohlavních buněk oproti savčím spermiím. Dalším hlediskem je rozdílné uskupení rozmnožovací soustavy, včetně chybějících přídatných pohlavních žláz u drůbeže. Problematika kryokonzervace drůbeže spočívá mimo jiné také v odlišnosti postupů mezi jednotlivými plemeny a liniemi (Long et al. 2010).

Úspěšnost kryokonzervace je závislá na výběru vhodného ředidla. Mezi nejčastěji používaná ředidla patří zejména modifikované BPSE a LAKE ředidlo. Avšak zmíněná ředidla jsou problematická z hlediska dostupnosti, časové náročnosti na přípravu a vysoké pořizovací ceny. Další nevýhodou modifikovaných ředidel představuje také chybovost lidského faktoru, protože při přípravě těchto ředidel je nezbytné dbát na správný poměr naředění.

Hlavní výhodou zvolených komerčních ředidel Poultry media<sup>®</sup>, Raptac<sup>®</sup> a NeXcell<sup>®</sup> je jejich dostupnost, nižší pořizovací cena a snadná uživatelská manipulace v laboratoři. Dalším přínosem těchto ředidel je jejich zabarvení. Jelikož má drůbeží sperma vyšší viskozitu, můžeme jednoduše zjistit, zda je připravovaný vzorek dostatečně homogenizovaný.

Cílem experimentu bylo zjistit, zda lze komerční ředidla použít i v procesu mražení. Předpokladem našeho pokusu bylo, že nejlepších výsledků by měly dosáhnout ty inseminační dávky, které byly připravovány pomocí ředidla NeXcell<sup>®</sup>. Toto ředidlo je obohaceno o antioxidanty a mělo by tudíž vykazovat vyšší hodnoty přežitelnosti spermií po rozmražení. Míra viability po rozmražení však dosahovala pouze hodnot 5,04 % ± 0,57. Očekávaných výsledků tak nebylo dosaženo. Naopak míra poškození spermatické plazmatické membrány byla statisticky nejvýznamnější právě u zmíněného ředidla. V případě použití ředidel Poultry media<sup>®</sup> a Raptac<sup>®</sup> bylo dosaženo nejlepších výsledků. Mezi těmito ředidly nebyl statisticky významný rozdíl.

Dle dostupných informací (viz Příloha I) ředidlo Poultry media<sup>®</sup> disponuje podobným složením jako BPSE. Poultry media<sup>®</sup> je navíc vylepšeno o zinek, který plní úlohu antioxidantu a o fosfatidylcholin, který podporuje integritu buněčných membrán.

V našem experimentu byl také porovnáván vliv různých teplot na funkční parametry spermií po rozmražení. Byly hodnoceny výsledky, které byly naměřeny při rozdílných teplotách - 5 °C a 40 °C. V obou případech byly rozmražené inseminační dávky vystaveny zmíněným teplotám po dobu 30 minut. Teplota 40 °C měla částečně simulovat teplotu

slepice, ve které se spermie pohybují ihned po inseminaci. Teplota 5 °C byla stanovena jako kontrolní. Předpokladem našeho pokusu bylo, že inseminační dávky ekvilibrované při teplotě 5 °C budou dosahovat lepších výsledků oproti teplotě 40 °C. Mezi oběma teplotami ekvibrace však nebyl prokázán statisticky významný rozdíl.

Diskutovaným tématem u kryokonzervace je stanovení optimálního poměru ředění ejakulátu a výběr vhodného kryoprotektantu. Z důvodu malých objemů spermatu u kohoutů, je snaha vytvořit co největší počet inseminačních dávek od jednoho plemeníka. Siudzińska & Łukaszewicz (2008) ve své studii ředili ejakulát v poměru 1:4, stejně tak Parker & McDaniel (2006). V našem pokusu byl zvolen odlišný poměr ředění ejakulátu 1:15, protože neexistují empiricky průkazná data ze stávajících studií. Thélie et al. (2019) doporučují používat inseminační dávky o koncentraci 200 mil. spermií. V našem pokusu byla určena koncentrace pro přípravu inseminačních dávek na 150 mil. spermií. Některé studie (Nabi et al. 2016) dosáhly dobrých výsledků i při nižších koncentracích, konkrétně Nabi et al. (2016) ve svém pokusu pracovali se vzorky o koncentraci 100 mil. spermií.

Mezi nejčastěji používané kryoprotektanty patří NMA (Sasaki et al. 2010), DMA (Blanco et al. 2012; Mosca et al. 2016; Abouelezz et al. 2017), DMSO (Rakha et al. 2018; Di Iorio et al. 2020) nebo GLY (Rakha et al. 2020; Wu et al. 2020). Při přípravě inseminačních dávek je třeba zohlednit i koncentraci daného kryoprotektantu. Dle posledních studií se ideální koncentrace kryoprotektantů pohybuje v rozmezí od 6 % do 9 % (Partyka et al. 2022). V našem pokusu byl aplikován kryoprotektant NMA o koncentraci 9 %. Naše studie vycházela z experimentu Mosca et al. (2016) a Sasaki et al. (2010), kde oba autoři dosáhli velmi dobrých výsledků právě díky aplikaci tohoto kryoprotektantu o stejné koncentraci. Ve studii Mosca et al. (2016) byla navíc zjištěna vyšší míra viability kohoutího spermatu ve srovnání s kryoprotektantem DMA. Sasaki et al. (2010) rovněž doporučují koncentraci NMA 9 % pro dosažení nejlepších výsledků viability kohoutích spermií. Při této koncentraci je zároveň částečně zabráněno kryopoškození cytoplazmatické membrány. Oproti tomu Pérez-Marín et al. (2019) ve své studii pozorovali, že použitím 9% NMA byla negativně ovlivněna *in vitro* fertilizace spermií.

K optimalizaci postupů kryokonzervace spermatu se rovněž vyžívá přidavku různých nepenetrujících kryoprotektivních látek (Mosca et al. 2016), antioxidantů (Sikka et al. 2001; Surai 2020). V našem pokusu byla zvolena taková varianta přípravy dávek, která by do budoucna mohla být snadno aplikovatelná i v praxi.

Další diskutovaná problematika v oblasti kryokonzervace kohoutího spermatu je výška a doba mražení inseminačních dávek nad hladinou tekutého dusíku. Madeddu et al. (2016) zkoumali vliv odlišné výšky mražení pejet nad hladinou tekutého dusíku. Na základě výsledku provedeného pokusu, doporučují umístit rack s pejetami do výšky od 1 až 5 cm nad hladinu tekutého dusíku během procesu mražení. Nejlepších výsledků viability a motility během mražení bylo dosaženo umístěním racku do výšky 3 cm nad hladinu, což se v našem pokusu nepotvrdilo. Z tohoto důvodu byl zvolen podobný postup jaký byl použit i ve studii Svoradová et al. (2019). Pejety byly mraženy ve výšce racku 5 cm nad hladinou tekutého dusíku. Doba

mražení byla kratší v porovnání se studií Svoradová et al. (2019), a to 10 min. Po uplynutí této doby byly pejety ponořeny přímo do tekutého dusíku.

Kvalita drůbežích inseminačních dávek po rozmražení je také ovlivněna postupem rozmražování (Di Iorio et al. 2016). Funkční parametry spermií dosahovaly nižších hodnot u procesu rozmražování při teplotě 37 °C po dobu 30 s (Santiago-Moreno et al. 2011; Madeddu et al. 2016) ve srovnání s rozmražováním při teplotě 5 °C po dobu 2 min (Hanzawa et al. 2010; Sasaki et al. 2010; Mphaphathi et al. 2016). Mosca et al. (2020) se zabývali méně běžným postupem rozmražování kohoutích inseminačních dávek, a to při teplotě 5 °C po dobu 100 s. V našem pokusu byl aplikován stejný postup rozmražování.

Základní hypotézou této práce bylo potvrdit předpoklad, že 9% koncentrace NMA aplikovaná společně s různými komerčními ředidly ejakulátu pozitivně ovlivní motilitu spermií po rozmražení. Výsledná motilita po rozmražení byla 15,87 % ± 17,07. Tuto hypotézu nelze s určitostí potvrdit nebo vyvrátit, neboť do výsledků významně vstupuje vliv ředidel na přežitelnost spermií po rozmražení. Nejlepších výsledků viability spermií bylo dosaženo v případě použití ředidel Poultry media® a Raptac® s hodnotami 51,02 % ± 0,60 a 50,80 % ± 0,54. Oproti tomu ředidlo NeXcell® vykazovalo negativní vliv na funkční parametry spermií po rozmražení.

## 8 Závěr

Česká slepice zlatá kropená je v současné době jediným původním českým plemenem drůbeže, které je zařazeno mezi genetické zdroje. Toto plemeno je začleněno v národním záchranném programu, ve kterém bylo v roce 2020 evidováno méně než 260 CZH jedinců. Proto je naprosto nezbytné vytvořit dostatečný genový rezervoár a rovněž definovat postup kryokonzervace spermatu tohoto plemene.

V současnosti neexistuje standardizovaný postup pro kryokonzervaci kohoutího spermatu. V dostupných studiích zabývajících se tímto tématem je vysoká míra diverzifikace, a to jak z pohledu aplikovaných postupů pro proces mražení a rozmražení, tak z pohledu aplikace rozdílných kryoprotektantů. Autoři se stále snaží objevit vhodný a efektivní způsob s průkaznými účinky v praxi. Bohužel stále je potřeba investovat do dalších studií a hledání vhodného kryoprotektantu. Dosavadní studie zabývající se kryokonzervací drůbežního spermatu stále nedosahují takových výsledků jako je tomu u ostatních hospodářských zvířat.

Cílem práce bylo optimalizovat postup mražení inseminačních dávek formou přidavku kryoprotektantu o dané koncentraci (NMA 9 %) k různým komerčním ředidlům, která se běžně používají pro ředění čerstvého spermatu drůbeže.

V rámci experimentu byly zkoumány tři druhy komerčních ředidel (Poultry media<sup>®</sup>, Raptac<sup>®</sup> a NeXcell<sup>®</sup>). Dále byl sledován vliv různých teplot ekvilibrace, kterým byly inseminační dávky vystaveny po rozmražení po dobu 30 minut.

U testovaných vzorků byla hodnocena celková motilita, viabilita buněk, poškození cytoplazmatické membrány, poškození akrozomu a dvojité poškození (cytoplazmatické membrány i akrozomu).

Nejlepších výsledků celkové motility a viability buněk dosahovaly inseminační dávky s přidavky ředidel Poultry media<sup>®</sup> a Raptac<sup>®</sup>, mezi kterými nebyl významný statistický rozdíl. Naproti tomu u ředidla NeXcell<sup>®</sup> byly zjištěny nejvyšší hodnoty poškození plazmatické membrány a nejvyšší výskyt dvojitého poškození buněk.

Do budoucna by bylo vhodné i nadále optimalizovat proces kryokonzervace drůbežích inseminačních dávek. Například pomocí nových kryoprotektantů nebo aditiv (např. trehalóza), které by přispěly ke zefektivnění celého procesu.

## 9 Literatura

Abouelezz FMK, Castaño C, Toledano-Díaz A, Estes MC, López-Sebastián A, Campo JL, Santiago-Moreno J. 2015. Effect of the Interaction Between Cryoprotectant Concentration and Cryopreservation Method on Frozen/Thawed Chicken Sperm Variables. *Reproduction in Domestic Animals* **50**: 135-141.

Abouelezz FMK, Castaño C, Toledano-Díaz A, Estes MC, López-Sebastián A, Campo JL, Santiago-Moreno J. 2015. Sperm–egg penetration assay assessment of the contraceptive effects of glycerol and egg yolk in rooster sperm diluents. *Theriogenology* **83**: 1541-1547.

Abouelezz FMK, Sayed MAM, Santiago-Moreno J. 2017. Fertility disturbances of dimethylacetamide and glycerol in rooster sperm diluents: Discrimination among effects produced pre and post freezing-thawing process. *Animal Reproduction Science* **184**: 228-234.

Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. 2017. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* **37**: 163-176.

Ahmed H, Jahan S, Salman MM, Ullah F. 2019. Stimulating effects of Quercetin (QUE) in tris citric acid extender on post thaw quality and in vivo fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Theriogenology* **134**: 18-23.

Aitken RJ, De Iuliis GN, Gibb Z, Baker MA. 2012. The simmet lecture: new horizons on an old landscape – oxidative stress, DNA damage and apoptosis in the male germ line. *Reproduction of domestic animal* **47**: 7-14.

Appiah MO, Li W, Zhao J, Liu H, Dong Y, Xiang J, Wang J, Lu W. 2020. Quercetin supplemented casein-based extender improves the post-thaw quality of rooster semen. *Cryobiology* **94**: 57-65

Blanco JM, Gee G, Wildt DE, Donoghue L. 2012. Species variation in osmotic cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle and peregrine falcon spermatozoa. *Biology of reproduction* **63**:1164–1171.

Blesbois E, Brillard JP. 2007. Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. *Animal* **1**: 1472-1481.

Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F, Mignon-Grasteau S, Saint Jalme M, Mialon-Richard MM. 2008. Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology* **69**: 252-261.

- Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F, Mignon-Grasteau S, Saint Jalme M, Mialon-Richard MM. 2008. Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology* **69**: 252–261.
- Blesbois E, Hermier D. 2003. Specificity of fatty acids in domestic birds spermatozoa. In *Phospholipids and male fertility* (ed. De Vriese). American Oil Chemist's Society Press, Champaign, USA. 73–85 p.
- Blesbois E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Science Journal* **63**: 213-222.
- Blesbois E. 2011. Freezing Avian Semen. *Avian Biology Research* **4**: 52-58.
- Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. 2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology* **585**: 325-337.
- Brillard JP. 2009. Practical aspects of fertility in poultry. *Avian Biology Research* **2**: 41-45.
- Buffone MG, Verstraeten SV, Calamera JC, Doncel GF. 2009 High cholesterol content and decreased membrane fluidity in human spermatozoa are associated with protein tyrosine phosphorylation and functional deficiencies. *Journal of Andrology* **30**: 552-558.
- Buss EG. 1993. Cryopreservation of Rooster Sperm. *Poultry Science* **72**: 944-954.
- Çiftci HB, Aygün A. 2018. Poultry semen cryopreservation technologies. *World's Poultry Science Journal* **74**: 699-710.
- Červený Č. 2000. *Veterinární anatomie: základy anatomie domácích ptáků*. Veterinární a farmaceutická univerzita, Fakulta veterinárního lékařství.
- Di Iorio IM, Cerolini S, Manchisi A. 2016. Overview of turkey semen storage: Focus on cryopreservation. *Annals of Animal Science*, **16**: 961–974.
- Di Iorio M, Rusco G, Iampietro R, Maiuro L, Schiavone A, Cerolini S, Iaffaldano N. 2020. Validation of the Turkey Semen Cryopreservation by Evaluating the Effect of Two Diluents and the Inseminating Doses. *Animals* **10**: 1329.
- Donoghue AM, Wishart GJ. Storage of poultry semen. *Animal reproduction science* 2000. **62**: 213–232.
- Eid Y, Ebeid T, Younis H. 2006. Vitamin E supplementation reduces dexamethasone-induced oxidative stress in chicken semen. *British Poultry Science* **47**: 350-356.

Elsayed M, El-Sherry TM, Abdelgawad M. 2015. Development of computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm motion in microfluidic environments using Image-J. *Theriogenology* **84**: 1367-1377.

Etches J.D. (2000): *Reproduction in Poultry*. Wallingford: CAB International Publishing, UK, 318 p.

Fattah A, Sharafi M, Masoudi R, Shahverdi A, Esmaeili V, Najafi A. 2017. L-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology* **74**: 148-153.

Fattah A, Sharafi M, Masoudi R, Shahverdi A, Esmaeili V. 2017. L-carnitine is a survival factor for chilled storage of rooster semen for a long time. *Cryobiology* **74**: 13-18.

Froman DP, Kirby JD, Proudman JA. 2000. *Reproduction in Poultry: Male and Female*. *Reproduction in Farm Animals* **16**: 237-257.

Froman DP, Thurston RJ. 1981. Chicken and turkey spermatozoal superoxide dismutase: a comparative study. *Biology of Reproduction* **24**: 193–200.

Hanzawa S, Niinomi T, Miyata T, Tsutsui M, Tajima A. 2010. Cryopreservation of chicken semen using N-methylacetamide as cryoprotective agent. *Japanese Poultry Science*, **47**: 27–32.

Herrera JA, Calderón G, Guzmán A, Vargas AK, Ávalos A, Rosales AM. 2017. Evaluation of two diluents for the storage of fresh and cryopreserved semen of Harris hawk (*Parabuteo unicinctus*). *Austral journal of veterinary sciences* **49**: 39-43.

Hinton BT, Snoswell AM, Setchell BP. 1979. Concentration of carnitine in the luminal fluid of the testis and epididymis of the rat and some other mammals. *Wiew Web of Science ResearcherID and ORCID* **56**: 105-&.

Chuaychu-noo N, Thananurak P, Chankitisakul V, Vongpralub T. 2017. Supplementing rooster sperm with Cholesterol-Loaded-Cyclodextrin improves fertility after cryopreservation. *Cryobiology* **74**: 8-12.

Janosikova M, Petricakova K, Ptacek M, Savvulidi FD, Rychtarova J, Fulka J. 2022. New approaches for long-term conservation of rooster spermatozoa. *Nepublikovaný manuskript*.

Johnson AL. 1986. *Reproduction in male*. *Avian physiology*.

Kelso KA, Cerolini S, Noble RC, Sparks NHC, Speake BK. 1996. Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 60 weeks of age. *Journal Reproduction Fertility* **106**: 201–6.

Kelso KA, Cerolini S, Speake BK, Cavalchini LG, Noble RC. 1997. Effects of dietary supplementation with  $\alpha$ -linolenic acid on the phospholipid fatty acid composition and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 weeks of age. *Journal Reproduction Fertility* **110**: 53–9.

Khan RU. 2011. Antioxidants and poultry semen quality. *World's Poultry Science Journal* **67**: 297-308.

Lançon R, Arruda RP, Alves MBR, Oliveira LZ, Santos GDC, Lemes KM, Florez-Rodriguez SA, Celeghini ECC. 2017. Validation of the CellRox Deep Red<sup>®</sup> fluorescent probe to oxidative stress assessment in equine spermatozoa. *Animal Reproduction* **14**: 437-441.

Lin H-LH, Blesbois E, Vitorino Carvalho A. 2022. Chicken semen cryopreservation: importance of cryoprotectants. *World's Poultry Science Journal* **78**: 139-160.

Lin YF, Chang SJ, Yang JR, Lee YP, Hsua L. 2005. Effects of supplemental vitamin E during the mature period on the reproduction performance of Taiwan native chicken cockerels. *British Poultry Science* **46**: 366-373

Long JA, Bongalhardo DC, Pelaéz J, Saxena S, Settar P, O'Sullivan NP, Fulton JE. 2010. Rooster semen cryopreservation: Effect of pedigree line and male age on postthaw sperm function. *Poultry Science* **89**: 966-973.

Long JA. 2006. Avian Semen Cryopreservation: What Are the Biological Challenges?. *Poultry Science* **85**: 232-236.

Lotfi S, Mehri M, Sharafi M, Masoudi R. 2017. Hyaluronic acid improves frozen-thawed sperm quality and fertility potential in rooster. *Animal Reproduction Science* **184**: 204-210.

Madeddu M, Mosca F, Abdel Sayed A, Zaniboni L, Mangiagalli MG, Colombo E, Cerolini S. 2016. 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. *Animal Reproduction Science* **171**: 58-64.

McKinnon KM. 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology* **120**.



- Mocé E, Grasseau I, Blesbois E. 2010. Cryoprotectant and freezing-process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. *Animal Reproduction Science* **122**: 359-366.
- Mohan J, Sastry KVH, Kataria JM. 2017. Process for the Preparation of CARI Poultry Semen Diluent' in patent office New Delhi. Patent filed on 28/02/2017, Application number 201711007119.
- Mohan J, Sharma SK, Kolluri G, Dhama K. 2018. History of artificial insemination in poultry, its components and significance. *World's Poultry Science Journal* **74**: 475-488.
- Mosca F, Madeddu M, Sayed AA, Zaniboni L, Iaffaldano N, Cerolini S. 2016. Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the quality of frozen/thawed chicken sperm. *Cryobiology* **73**: 343-347.
- Mosca F, Zaniboni L, Abdel Sayed A, Iaffaldano N, Soglia D, Schiavone A, Cerolini S. 2020. Effect of N-Methylacetamide Concentration and Thawing Rate on Chicken Sperm Quality after Cryopreservation. *Animals* **10**: 824.
- Mosca F, Zaniboni L, Abdel Sayed A, Madeddu M, Iaffaldano N, Cerolini S. 2019. Effect of dimethylacetamide and N-methylacetamide on the quality and fertility of frozen/thawed chicken semen. *Poultry Science* **98**: 6071-6077.
- Motta JPR, Paraguassú-Braga FH, Bouzas LF, Porto LC. 2014. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. *Cryobiology* **68**: 343-348.
- Mphaphathi ML, Seshoka MM, Luseba D, Sutherland B, Nedambale T. L. 2016. The characterisation and cryopreservation of Venda chicken semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction* **5**: 132-139.
- Nabi MM, Kohram H, Zhandi M, Mehrabani-Yeganeh H, Sharideh H, Zare-Shahaneh A, Esmaili V. 2016. Comparative evaluation of Nabi and Beltsville extenders for cryopreservation of rooster semen. *Cryobiology* **72**: 47-52.
- Nikolova K, Kaloyanova S, Mihaylova N, Stoitsova S, Chausheva S, Vasilev A, Lesev N, Dimitrova P, Deligeorgiev T, Tchorbanov A. 2013. New fluorogenic dyes for analysis of cellular processes by flow cytometry and confocal microscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **129**: 125-134.
- Parker HM, Mcdaniel CD. 2006. The immediate effect of semen diluent and rate of dilution on the sperm quality index, ATP utilization, gas exchange, and ion balance of broiler breeder sperm. *Poultry Science* **85**: 106-116.

Partyka A, Bonarska-Kujawa D, Sporniak M, Strojecki M, Nizański W. 2016. Modification of membrane cholesterol and its impact on frozen–thawed chicken sperm characteristics. *Zygote* **24**: 714-723.

Partyka A, Nizański W. 2022. Advances in storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106921.

Pearlin VB, Mohan J, Tyagi JS, Gopi M, Kolluri G, Prabakar G, Shanmathy M. 2020. Efficiency of Different Diluents and Dilution Rates on the Fertilization Potential of Chicken Spermatozoa. *Indian Journal of Animal Research*. **55**: 139-144.

Pérez-Marín CC, Arando A, Mora C, Cabello A. 2019. Fertility after insemination with frozen-thawed sperm using N-methylacetamide extender on the Combatiente Español avian breed. *Animal Reproduction Science* **208**: 106111

Purdy PH, Song Y, Silversides FG, Blackburn HD. 2009. Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. *Poultry Science* **88**: 2184-2191.

Rakha BA, Qurrat-ul-Ain, Ansari MS, Akhter S, Akhter A, Awan MA, Santiago-Moreno J. 2020. Effect of Quercetin on Oxidative Stress, Mitochondrial Activity, and Quality of Indian Red Jungle Fowl (*Gallus gallus murghi*) Sperm. *Biopreservation and Biobanking* **18**: 311-320.

Rubinsky B, Perez PA, Carlson ME. 2005. The thermodynamic principles of isochoric cryopreservation. *Cryobiology* **50**: 121-138.

SAS Institute Inc. Base SAS 9.4 Procedures Guide: Statistical Procedures, 2nd ed.; Statistical Analysis System Institute Inc.: Cary, NC, USA, 2013.

Sasaki KT, Tatsumi M, Tsutsui T, Niinomi T, Imai M, Naito A, Tajima Y, Nishi. 2010. A method for cryopreserving semen from Yakido roosters using N-methylacetamide as a cryoprotective agent. *Japan Poultry Science* **47**: 297–301.

Scanes CG, Butler LD, Kidd MT. 2020. Chapter 20 - Reproductive management of poultry. *Animal Agriculture* **20**: 349-366.

Seifi-Jamadi A, Kohram H, Zare Shahneh A, Ansari M, Macías-García B. 2016. Quercetin Ameliorate Motility in Frozen-Thawed Turkmen Stallions Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science* **45**: 73-77.

Sharma RK. & Agarwal A. 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Journal of Urology* **48**: 835-850.

- Siari S, Mehri M, Sharafi M. 2021. Supplementation of Beltsville extender with quercetin improves the quality of frozen-thawed rooster semen. *British Poultry Science* **26**: 1-9.
- Sikka S. 2001. Relative Impact of Oxidative Stress on Male Reproductive Function. *Current Medicinal Chemistry* **8**: 851-862.
- Silva ECB, Arruda LCP, Silva SV, Souza HM, Guerra MMP. 2016. High resveratrol or quercetin concentrations reduce the oscillation index of frozen goat semen. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **68** :1237-1243.
- Silva ECB, Cajueiro JFP, Silva SV, Soares PC, Guerra MMP. 2012. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology* **77**: 1722-1726.
- Siudzińska A, Łukaszewicz E. 2008. Effect of Semen Extenders and Storage Time on Sperm Morphology of Four Chicken Breeds. *Journal of Applied Poultry Research* **17**: 101-108.
- Stradaioli G, Sylla L, Zelli R, Verini Supplizi A, Chiodi P, Arduini A, Monaci M. 2000. Seminal carnitine and acetylcarnitine content and carnitine acetyltransferase activity in young Maremmano stallions. *Animal Reproduction Science* **64**: 233-245.
- Surai PF. 2020. Antioxidants in Poultry Nutrition and Reproduction: An Update. *Antioxidants* **9**.
- Svoradova A, Kuzelova L, Vasicek J, Balazi A, Olexikova L, Makarevich A, Chrenek P. 2021. Rooster spermatozoa cryopreservation and quality assessment. *Cryoletters* **42**: 59-66.
- Sysmex. 2022. Available from <https://eu.sysmex-flowcytometry.com/consumables/sample-tubes-and-accessories/2948/96-well-plates#> (accessed April 2022).
- Thananurak P, Chuaychu-noo N, Thélie A, Phasuk Y, Vongpralub T, Blesbois E. 2019. Sucrose increases the quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperms in contrast to raffinose. *Poultry Science* **98**: 4161-4171.
- Thélie A, Bailliard A, Seigneurin F, Zerjal T, Tixier-Boichard M, Blesbois E. 2019. Chicken semen cryopreservation and use for the restoration of rare genetic resources. *Poultry Science* **98**: 447-455.
- Tselutin K, Narubina L, Mavrodina T, Tur B. 1995. Cryopreservation of poultry semen. *British Poultry Science* **36**: 805–811.
- Tvrda E, Tušimová E, Kováčik A, Paál D, Libová L, Lukáč N. 2016. Protective Effects of Quercetin on Selected Oxidative Biomarkers in Bovine Spermatozoa Subjected to Ferrous Ascorbate. *Reproduction in Domestic Animals* **51**: 524-537.

VÚŽV. Česká slepice zlatá kropená. Available at <https://genetickezdroje.cz/narodni-program-uvod/drubez/narodni-program-drubez-ceska-slepice-zlata-kropenata> (accessed April 16, 2022).

Wilkerson MJ. 2012. Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **42**: 53–71.

Wu BX, Yang XH, Yan HF. 2020. Improving the quality of rooster semen frozen in straws by screening the glycerol concentration and freezing rate. *British Poultry Science* **61**: 173-179.

Zaniboni L, Cassinelli C, Mangiagalli MG, Gliozzi TM, Cerolini S. 2014. Pellet cryopreservation for chicken semen: Effects of sperm working concentration, cryoprotectant concentration, and equilibration time during in vitro processing. *Theriogenology* **82**: 251-258.

## 10 Seznam použitých zkratek a symbolů

ACTH	Adrenokortikodní hormon
ATP	Adenosintrifosfát
BPSE	Beltsvillie Poultry Semen Extender
CASA	Počítačem asistovaná analýza spermií
CZH	Česká slepice zlatá kropená
DMA	Dimethylsulfoxid
DNA	Nukleová kyselina
ID	Inseminační dávka
FC	Flow cytometry
FSC	Přímý rozptyl
FSH	Folikulostimulační hormon
KKS	Kompletní krmná směs
LC	L- Carnitin
LH	Luteinizační hormon
mM	Milimol
NaCl	Chlorid draselný
NMA	N-methylacetamid
NX	NexCell
PM	Poultry ředidlo
PRL	Prolaktin
PUFA	Polynenasycených mastných kyselin
Q	Quecentrin
R	Raptac
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SSC	Boční rozptyl
STH	Somatotropin
THW	Rozmražený
TSH	Tyreotropní hormon
Yo-Pro1	Barvivo
SEM	Směrodatná odchylka

## 11 Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázek 1: Pohlavní ústrojí ptáků (převzato: Johnson 1986) .....	11
Obrázek 2: Spermie kohouta (vlastní zdroj).....	12
Obrázek 3: Spermie berana (vlastní zdroj).....	12
Obrázek 4: Popis drůbeží spermie (převzato: Johnson 1986).....	13
Obrázek 5 Spermie obarveny pomocí fluorescenčních barviv (Janosikova M, Petricakova K, Ptacek M, Savvulidi FD, Rychtarova J, Fulka J. 2022. New approaches for long-term conservation of rooster spermatozoa. Nепublikovaný manuskript.).....	25
Obrázek 6 Přední a boční projekce CASA (dostupné z <a href="http://www.isperm.co">www.isperm.co</a> ) .....	26
Obrázek 7 Pejety s inseminační dávkou umístěné na racku (foto autor) .....	28
Obrázek 8 Průtokový cytometr NovoCyte (foto autor).....	29
Obrázek 9 96 jamkový plate na FC (dostupné z <a href="https://eu.systems-mex-flowcytometry.com/consumables/sample-tubes-and-accessories/2948/96-well-plates">https://eu.systems-mex-flowcytometry.com/consumables/sample-tubes-and-accessories/2948/96-well-plates</a> ) .....	29
Tabulka 1 Harmonogram odběru .....	27
Tabulka 2: Základní statistické charakteristiky – CASA .....	31
Tabulka 3: Vliv použitého ředidla na celkovou motilitu po rozmražení.....	31
Tabulka 4 Základní statistické charakteristiky FC.....	32
Tabulka 5: Vliv odběrového dne na viabilitu spermií po rozmražení .....	34
Tabulka 6: Vliv zvoleného ředidla .....	35
Tabulka 7: Vliv teploty ekvilibrace po rozmražení .....	35
Tabulka 8: Vliv odběrového dne na poškození cytoplazmatické membrány po rozmražení.....	36
Tabulka 9: Vliv teploty na akrozomální poškození spermií po rozmražení.....	37
Tabulka 10: Vliv teploty na poškození plazmatické membrány i akrozomu spermií po rozmražení .....	37
Tabulka 11 Vliv zvoleného ředidla na poškození cytoplazmatické membrány spermií po rozmražení.....	38
Tabulka 12 Vlivem zvoleného ředidla a teploty ekvilibrace na akrozomálním poškození spermií na rozmražení.....	38
Tabulka 13 Vliv zvoleného ředidla na poškození akrozomu a plazmatické membrány spermií po rozmražení.....	39
Tabulka 14: Vliv teploty ekvilibrace na funkční parametry spermií po rozmražení .....	40
Graf 1 Průměrné hodnoty pozorovaných parametrů spermií–FC .....	33
Graf 2: Vliv odběrového dne na viabilitu spermií po rozmražení .....	34
Graf 3: Vliv zvoleného ředidla na akrozomální poškození spermií po rozmražení při teplotách ekvilibrace 5 °C a 40 °C .....	39
Graf 4: Vliv zvoleného ředidla na poškození akrozomu a cytoplazmatické membrány .	40

# 12 Samostatné přílohy

## Příloha I: Poultry Media patent



US 20080199846A1

(19) **United States**  
 (12) **Patent Application Publication** (10) **Pub. No.: US 2008/0199846 A1**  
**Long** (43) **Pub. Date: Aug. 21, 2008**

(54) **POULTRY SEMEN EXTENDER** (52) **U.S. CL. .... 435/2**

(76) **Inventor: Julie Long, Sykesville, MD (US)**

**Correspondence Address:**  
**USDA, ARS, OTT**  
**5601 SUNNYSIDE AVE, RM 4-1159**  
**BELTSVILLE, MD 20705-5131 (US)**

(21) **Appl. No.: 12/069,292**

(22) **Filed: Feb. 8, 2008**

**Related U.S. Application Data**

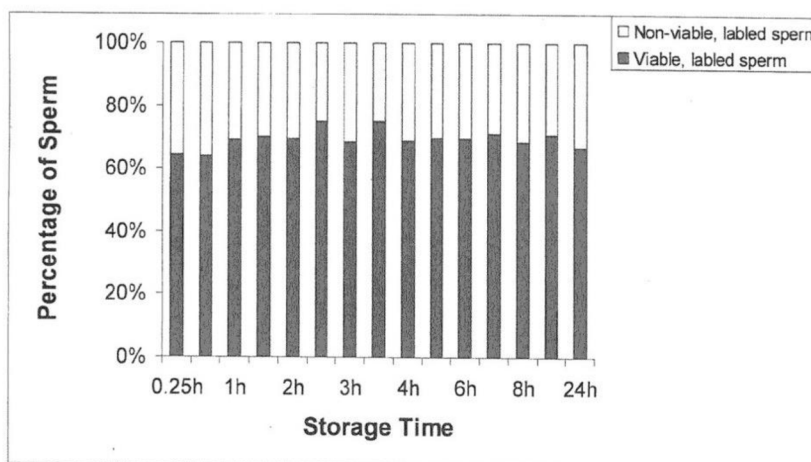
(60) **Provisional application No. 60/900,473, filed on Feb. 9, 2007.**

**Publication Classification**

(51) **Int. Cl. (2006.01)**  
**A01N L/02**

(57) **ABSTRACT**

A medium for preserving and extending the viable useful life of poultry (e.g., turkey) semen, in vitro, is provided. Semen is preserved without loss of fertility for up to about 24 hours in the medium. The medium contains di-potassium phosphate, sodium glutamate, fructose, sodium acetate, mono-potassium phosphate, potassium citrate, magnesium chloride, N-tris hydroxymethyl methyl-2-aminoethane sulfonic acid, phosphatidylcholine, and zinc, and optionally sialic acid, carnitine, serine ethanolamine phosphodiesterase, or mixtures thereof. A method for extending the fertility of poultry (e.g., turkey) semen for up to about 24 hours when held in vitro at about 5° to about 10° C., involving mixing poultry (e.g., turkey) semen containing live spermatozoa with an aqueous medium containing di-potassium phosphate, sodium glutamate, fructose, sodium acetate, mono-potassium phosphate, potassium citrate, magnesium chloride, N-tris hydroxymethyl methyl-2-aminoethane sulfonic acid, phosphatidylcholine, and zinc, and optionally at least one of sialic acid, carnitine, serine ethanolamine phosphodiesterase, or mixtures thereof.



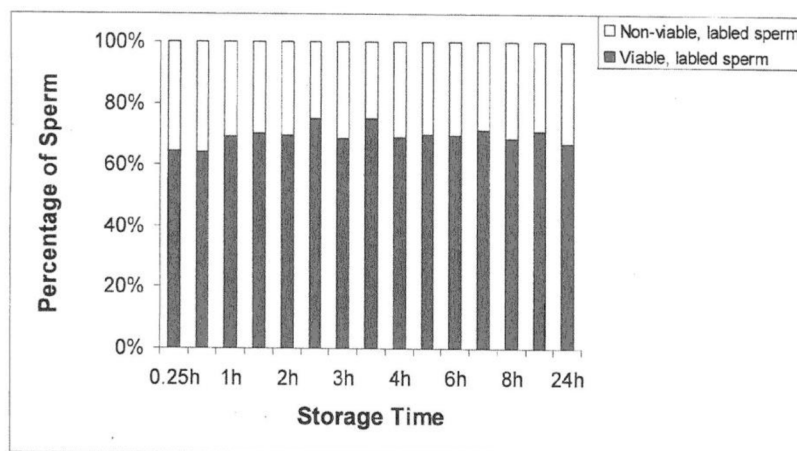


Figure 1



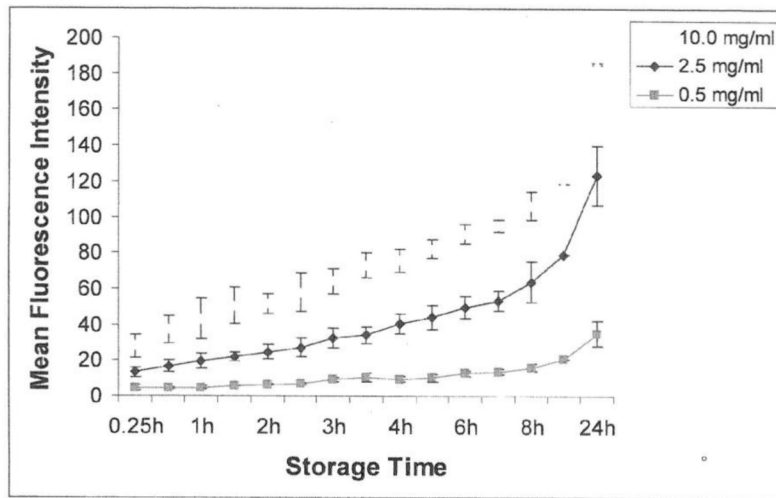


Figure 2

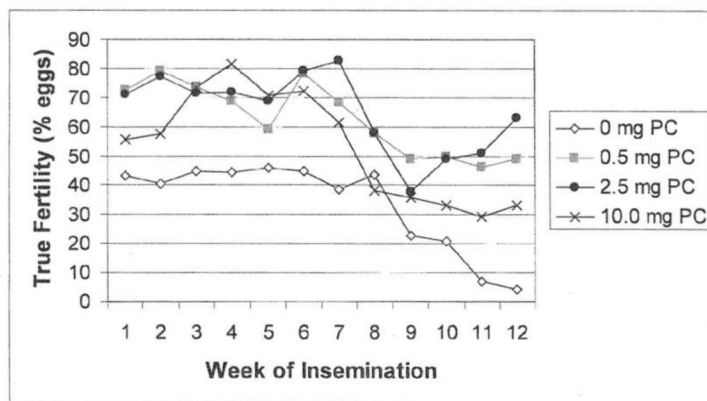


Figure 3

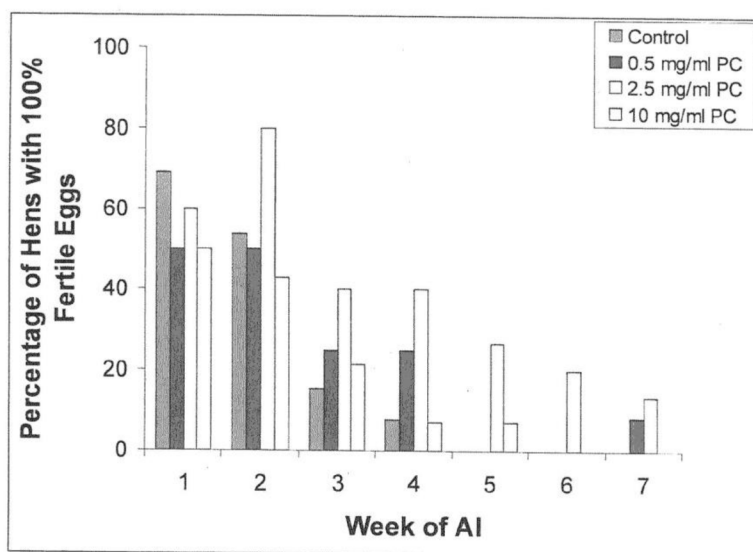


Figure 4A

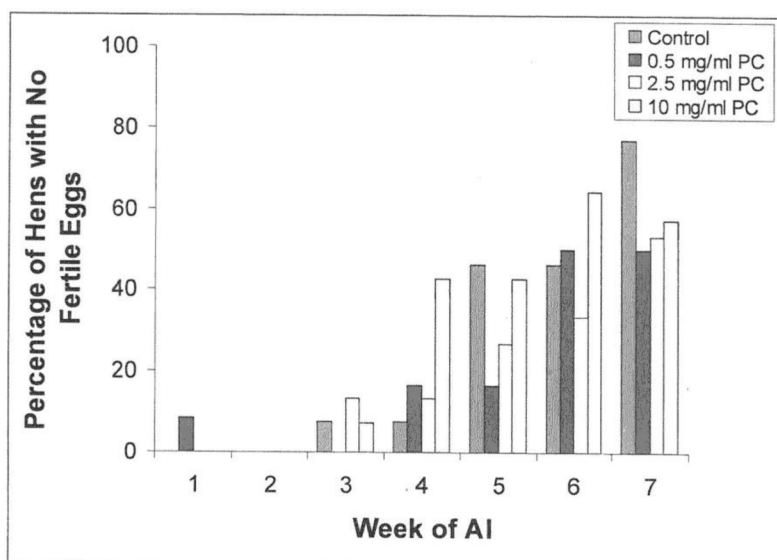


Figure 4B

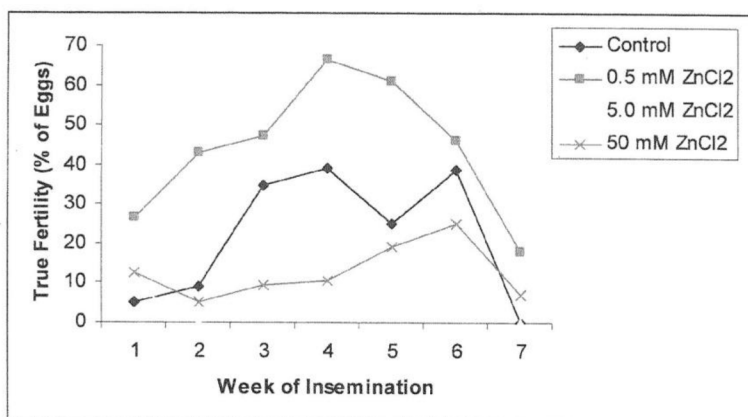


Figure 5

**POULTRY SEMEN EXTENDER**

## REFERENCE TO RELATED APPLICATION

**[0001]** This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/900,473, filed 9 Feb. 2007, which is incorporated herein by reference in its entirety.

## BACKGROUND OF THE INVENTION

**[0002]** The present invention relates to a medium for diluting and preserving poultry (e.g., turkey) semen without critical loss in sperm viability and more particularly to a medium for extending the useful life of poultry semen. The medium contains di-potassium phosphate, sodium glutamate, fructose, sodium acetate, mono-potassium phosphate, potassium citrate, magnesium chloride, N-tris hydroxymethyl methyl-2-aminoethane sulfonic acid, phosphatidylcholine, and zinc, and optionally at least one of sialic acid, carnitine, serine ethanolamine phosphodiesterase, or mixtures thereof. The present invention also relates to a method for extending the fertility of turkey semen for up to 24 hours when held in vitro at about 5° to about 10° C. (e.g., 5° to 10° C.), involving mixing poultry (e.g., turkey) semen containing live spermatozoa with an aqueous medium containing di-potassium phosphate, sodium glutamate, fructose, sodium acetate, mono-potassium phosphate, potassium citrate, magnesium chloride, N-tris hydroxymethyl methyl-2-aminoethane sulfonic acid, phosphatidylcholine, zinc, and optionally at least one of sialic acid, carnitine, serine ethanolamine phosphodiesterase, or mixtures thereof.

**[0003]** Poultry semen is viscous and highly concentrated, containing sperm concentrations of 6 billion (chicken) to 12 billion (turkey) sperm per ml of ejaculate. After collection, poultry semen must be extended with buffered salt solutions, or diluents, to maintain the viability of sperm in vitro. Dilution also is advantageous in that more hens can be inseminated from a single semen sample. There are many variations in diluent compositions; however, the basic goals are to maintain pH and osmolality, as well as provide an energy source for metabolism.

**[0004]** Diluents currently being used are modifications of formulas developed at least 15 years ago, and are intended for extending fresh semen rather than storing semen for longer than 6 h. Alterations in pH and provision of an aerobic environment have enabled several diluents to maintain viable turkey sperm during liquid storage at 5°-10° C. Under these conditions, commercially acceptable fertility rates are obtained from turkey sperm stored up to 6 h. Because current liquid storage protocols (6 h) do not support adequate fertility levels for the duration of the 24-26 wk long egg production season, there is a need to develop alternative diluents and/or methods specifically for liquid semen storage. Ideally, this diluent would be used at ambient temperature and maintain sperm fertilizing capacity for 24 h or longer.

## SUMMARY OF THE INVENTION

**[0005]** In accordance with the present invention there is provided a medium for diluting and preserving poultry (e.g., turkey) semen without critical loss in sperm viability and more particularly to a medium for extending the useful life of poultry semen. The medium contains di-potassium phosphate, sodium glutamate, fructose, sodium acetate, mono-potassium phosphate, potassium citrate, magnesium chloride, N-tris hydroxymethyl methyl-2-aminoethane sulfonic

acid, phosphatidylcholine, and zinc, and optionally at least one of sialic acid, carnitine, serine ethanolamine phosphodiesterase, or mixtures thereof.

**[0006]** Also in accordance with the present invention there is provided a method for extending the fertility of poultry (e.g., turkey) semen for up to 24 hours when held in vitro at about 5° to about 10° C. (e.g., 5° to 10° C.), involving mixing poultry (e.g., turkey) semen containing live spermatozoa with an aqueous medium containing di-potassium phosphate, sodium glutamate, fructose, sodium acetate, mono-potassium phosphate, potassium citrate, magnesium chloride, N-tris hydroxymethyl methyl-2-aminoethane sulfonic acid, phosphatidylcholine, and zinc, and optionally at least one of sialic acid, carnitine, serine ethanolamine phosphodiesterase, or mixtures thereof.

## BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

**[0007]** FIG. 1 shows percentages of (1) non-viable, labeled sperm and (2) viable, labeled sperm during 24 h in vitro storage of turkey semen (n=4 replicates).

**[0008]** FIG. 2 shows mean fluorescence intensity of turkey sperm incubated with three concentrations of NBD (fluorochrome)-phosphatidylcholine (0.5, 2.5, 10.0 mg/ml) at specific time-points during 24 h in vitro storage (n=4 replicates). Phosphatidylcholine uptake was dose-dependent (p<0.05).

**[0009]** FIG. 3 shows true fertility of 24 h-stored turkey semen supplemented with 0.0, 0.5, 2.5 or 10.0 mg/ml phosphatidylcholine (n=4 replicates). For wks 1-7, fertility of each treatment was higher (p<0.05) than control semen.

**[0010]** FIG. 4 shows: (A) percentage of hens laying all (100%) fertile eggs after AI with control or PC-treated stored semen. For wks 2-7, more (p<0.05) hens from the 2.5 mg/ml PC were in this fertility category than any other sperm treatment group. (B) Percentage of hens laying all unfertilized eggs after AI with control or PC-treated stored semen. For wks 4 and 10, more (p<0.05) hens from the 10.0 mg/ml PC treatment were in this fertility category than any other sperm treatment group.

**[0011]** FIG. 5 shows true fertility of 24 h-stored turkey semen supplemented with 0.0, 0.5, 5.0 or 50.0 mM ZnCl<sub>2</sub>. For wks 1-7, fertility of the 5.0 mM treatment was higher (p<0.05) than other ZnCl<sub>2</sub> treatments or control semen.

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

**[0012]** I have found that phosphatidylcholine counteracts the damaging effects of lipid peroxidation during in vitro storage for 24 h at 4° C. by providing exogenous phospholipids for incorporation into poultry sperm plasma membrane. Preferably zinc is also utilized.

**[0013]** Most turkeys throughout the world are bred by artificial insemination, not because of the genetic merit to be gained through artificial insemination but primarily because the size of the turkey male attained through genetic selection makes them unable to perform natural mating. Much effort is made to use a suitable diluent for extending semen in order to reduce production costs. Methods to store semen for at least about 24 hours (e.g., at least 24 hours) would help to attain this objective. Consequently, intensive investigations have been made to determine what components and conditions are required for extending and preserving both chicken and turkey semen.

**[0014]** A number of synthetic solutions that extend as well as aid in semen preservation have been formulated and tested.

It has been determined that components selected for semen extenders should provide exogenous energy sources, proper osmotic balance, sufficient buffering capacity, control of bacterial growth, and some chelating action to protect against toxic ions.

**[0015]** Although it is not known which components in semen extenders are critical for the support of sperm viability during storage in vitro, it has been concluded by researchers in the field that chicken and turkey spermatozoa retain their full fertilizing ability in media having wide ranges in both osmolarity ( $\Delta$ , 0.455° to 0.736° C.) and pH level (pH 6.0 to 8.0). The optimal temperature for storing undiluted turkey semen appears to be 15° C.; even at this temperature, however, preservation without serious loss of fertilizing capacity has usually been limited to a few hours. Undiluted turkey semen is extraordinarily sensitive to temperatures above and below 15° C. Turkey spermatozoa usually perishes within a few minutes outside of the body even in its own seminal fluid. In fact, prior to U.S. Pat. No. 4,329,337, diluted turkey semen lost considerable fertilizing capacity when stored in various diluents for six hours regardless of the temperature at which it was held. This is in contrast with the fertilizing capacity of diluted chicken semen which can be maintained for 24 to 48 hours without serious loss of that capacity when stored at 2° to 5° C.

**[0016]** In the practice of this invention semen containing live spermatozoa is collected from birds either directly into the medium of this invention or into a tube and added to the medium and the mixture of semen and medium is stored at from about 5° to about 10° C. (e.g., 5° to 10° C.) in vitro until it is used to inseminate a plurality of female birds. The medium of this invention has the following formulation (before addition of about 0.5-2.5 mg/ml Phosphatidylcholine (PC) it is referred to as Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE)):

Potassium diphosphate•3H <sub>2</sub> O	12.7 g/L
Sodium glutamate	8.67 g/L
Fructose (anhydrous)	5 g/L
Sodium acetate•3H <sub>2</sub> O	4.3 g/L
TES (N-tris Hydroxymethyl methyl-2-aminoethane sulfonic acid)	1.95 g/L
Potassium citrate	0.64 g/L
Potassium monophosphate	0.65 g/L
Magnesium chloride•6H <sub>2</sub> O	0.34 g/L

**[0017]** In preparing the medium (without PC), sterilized glassware or other type of container is used and filtering is done in a closed system. The prepared medium is dispensed in airtight containers. The weighed amount of each constituent is put into a large beaker or other container and the aggregate of constituents is mixed for about 30 to 60 minutes with 900 ml of distilled water. The pH of the medium is adjusted to 6.50±0.1 by addition of 12 N HCl and the osmolarity is adjusted to 350±10 m.osmols by addition of distilled water (the addition will bring the total amount of water to about 1 liter). The mixture is then filtered through a microfilter having a pore size of 0.22 millimicrons. Before packaging the medium in sterile vials or other suitable containers, it is tested by the brain-heart infusion medium technique to make certain that it does not contain any microbial contamination. The pH and osmolarity are also checked at this time. A stock solution (25 mg/ml) of lyophilized PC is prepared using the above medium as the diluent. The stock solution is passed through a

mini-extruder 21 times fitted with 0.1  $\mu$ m membranes to achieve unilamellar vesicles. Hydrated lipid solutions initially will form large, multi-lamellar vesicles which impact the final desired lipid concentration. After the initial pass through a membrane, the particle size distribution will tend towards a bimodal distribution. After sufficient passes through the membrane, a unimodal, normal distribution is obtained. Serial dilutions will be used to make 2 $\times$  working solutions of 20 mg/ml, 5 mg/ml and 1 mg/ml that yielded the final desired PC concentrations upon 1:1 dilution of fresh semen.

**[0018]** In the practice of this invention the extender medium is prepared as described above. Semen is collected from a plurality of male birds either directly into the medium or into a tube and the semen then mixed with the medium. The semen and medium are mixed at a 1:1 ratio on a volume basis. The mixture of semen containing live spermatozoa and medium can be stored in vitro for up to about 24 hours (e.g., up to 24 hours) at about 5° to about 10° C. (e.g., 5° to 10° C.) without loss of fertilizing capacity. The mixture of semen and extender medium is used to inseminate a plurality of female birds.

**[0019]** One of the important benefits provided by this invention is the reduction in manpower required to artificially inseminate a large number of female birds. Collected semen does not have to be used immediately; it can be collected and kept for up to 24 hours without loss of fertilizing capacity before being used.

**[0020]** The extender medium preferably also contains at least one source of zinc at a concentration of generally about 0.1 mM to about 3 mM (e.g., 0.1-3 mM) or about 0.01 to 0.41 g/L (e.g., 0.01-0.41 g/L), preferably about 0.3 to about 1 mM (e.g., 0.3-1 mM) or about 0.04 to 0.14 g/L (e.g., 0.04-0.14 g/L), more preferably about 0.4 to about 0.7 mM (e.g., 0.4-0.7 mM) or about 0.05 to 0.1 g/L (e.g., 0.05-0.1 g/L), and most preferably about 0.5 mM (e.g., 0.5 mM) or about 0.07 g/L (e.g., 0.07 g/L). By "a source of zinc" is generally meant herein a compound in the form of Zn<sup>2+</sup> ions. Suitable examples may for instance include bioavailable zinc salts, including but not limited to salts with inorganic anions such as chloride, carbonate and sulphate, but also zinc salts with organic anions such as lactate, gluconate, fructosephosphates, orotate, citrate, malate, pyruvate, etc. and complexes of zinc with an organic molecule such as an amino acid, or bi- or tridentate compound; or any suitable combination thereof. The extender medium may also contain sialic acid, carnitine (L-carnitine hydrochloride), or serine ethanolamine phosphodiesterase, or any mixture thereof.

**[0021]** Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which the invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are now described.

**[0022]** The following examples are intended only to further illustrate the invention and are not intended to limit the scope of the invention as defined by the claims.

#### EXAMPLES

**[0023]** Materials and Methods. Animals: Large White breeder poult were purchased from a primary breeder and maintained under standard management conditions during the brooding and growing periods. At 28 wk of age, toms were

photostimulated by increasing light exposure from a 12:12 to a 14:10 light:dark cycle to initiate semen production. Using the abdominal massage semen collection method (Burrows, W. H., and J. P. Quinn, *Poult. Sci.*, 14: 251-254 (1935)), toms were pre-milked at 30 wk of age and then screened for semen quality at 31 and 32 wk of age prior to being designated to sperm storage treatment groups. At 32 wk of age, hens were photostimulated by increasing the daily light exposure from 6:18 to 14:10 h (light:dark) to initiate ovarian development and egg production. Hens were inseminated on Days 10 and 12 after photostimulation and then once per week for the next 12 wk of egg production. A total of 10 toms and 76 hens were used for each experimental replicate.

**[0024]** Semen Collection, Evaluation and Storage: Semen was collected weekly from toms and evaluated for volume, sperm concentration, sperm viability, and sperm motility. Fresh semen was aliquoted for the control and 3 sperm treatments. Control semen was extended 1:1 with Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE), while treated semen was extended 1:1 with BPSE supplemented with 0.5, 2.5 or 10.0 mg/ml phosphatidylcholine (PC). Extended semen was transferred to 48-well culture plates. Multiwell plates were placed in a room temperature water bath on an orbital shaker (125 rpm) and slowly cooled to 4° C. with lids loosely fitted to ensure air availability during agitation. Semen was maintained under these conditions for 24 h.

**[0025]** Media Preparation: A stock solution (25 mg/ml) of lyophilized PC was prepared using BPSE as the diluent. The stock solution was passed through a mini-extruder 21 times fitted with 0.1 µm membranes to achieve unilamellar vesicles. Hydrated lipid solutions initially formed large, multi-lamellar vesicles which impacted the final desired lipid concentration. After the initial pass through a membrane, the particle size distribution tended towards a bimodal distribution. After 21 passes through the membrane, a unimodal, normal distribution was obtained. Serial dilutions were used to make 2× working solutions of 20 mg/ml, 5 mg/ml and 1 mg/ml that yielded the final desired PC concentrations upon 1:1 dilution of fresh semen. An additional set of media was prepared as described above except that the media contained ZnCl<sub>2</sub> at either 0.5 mM, 5.0 mM, or 50 mM. New stock and working solutions of PC were prepared each week. Phosphatidylcholine Uptake: Stock and working PC solutions were prepared as previously described except PC was labeled with the fluorochrome NBD. Fresh semen was extended 1:1 to contain 0, 0.5, 2.5 or 10 mg NBD-PC and stored at 4° C. for 24 h as described above. Semen aliquots were removed at 30 min intervals during the first 4 h of storage and at 1 h intervals from 8-24 h of storage for evaluation by flow cytometry. Aliquots were diluted in PC-free BPSE to 1×10<sup>7</sup> sperm/ml and counterstained with the viability probe propidium iodide (12 µM; PI). A Beckman-Coulter Epics XL-MCL Analyzer equipped with a single 488 nm excitation source was used for all flow cytometric analyses. Forward and side scatter gating were used to select single sperm from clumps and debris. The fluorescence from NBD-stained and PI-stained spermatozoa was collected in FL1 (525 nm BP) and FL3 (620 nm BP) fluorescence detectors, respectively. The percentages of NBD-stained cells and the mean NBD fluorescence intensity/cell (MnFI) of the viable sperm population was recorded from the FL1 detector output to determine the magnitude of PC incorporation into the plasma membrane. The PC uptake experiments were replicated four times using different male flocks.

**[0026]** Fertility Evaluation: A total of 304 hens (76/replicate) were artificially inseminated weekly with semen stored with 0.5 mg PC/ml (n=19), 2.5 mg PC/ml (n=19), 10 mg PC/ml (n=19) or without PC (control, n=19). An additional set of hens were inseminated weekly with stored semen containing 2.5 mg/ml PC and either 0.5 mM, 5.0 mM, or 50 mM ZnCl<sub>2</sub>; prior to insemination, semen stored in the presence of ZnCl<sub>2</sub> was treated with EDTA to chelate Zn ions and restore sperm motility. The inseminant dose for all treatments was 150×10<sup>6</sup> sperm. This sperm number is less than that typically inseminated for commercial production; however, I desired a system sufficiently sensitive to detect even small changes in fertility due to sperm treatment. Eggs were candled after 7 d of incubation to determine true fertility and allowed to hatch to determine hatchability. Fertility trials were replicated 4 times using different flocks.

**[0027]** Statistical Analysis: Prior to analysis, data were checked to determine if a transformation was necessary. As expected, variables scored as percents (e.g., fertility) required transformation. I used the standard variance stabilizing arcsine transformation,  $y = \arcsin(\sqrt{x})$ , where  $x$  represents the data, recorded as a proportion, and  $y$  is the scale used in the analysis. This transformation stabilized the variances sufficiently to proceed with an analysis in a mixed models framework. Software for conducting mixed models analyses in non-Gaussian frameworks, e.g., logistic regression, is not yet readily available. The mixed models I developed, estimated using Proc Mixed (SAS Institute, 1999), considered sperm treatment and week of study as fixed factors, with hen as a random factor. In addition, since data were taken from the same individuals repeatedly, thus inducing correlation, I allowed for within-individual time series correlation using an autoregressive structure. To ensure that my sample size and design had sufficient power to accurately determine the effects of the sperm treatments, I did a small simulation study prior to finalizing the design. Power was reassessed once the study was complete, and I report those results below. I used the default REML estimation method in Proc Mixed. For modeling fertility, I assumed the variance on the transformed scale due to sampling eggs was 0.25/n, where  $n$  is the number of eggs/hen/week (Steele, R. G. D., and J. H. Torrie, *Principles and Procedures of Statistics with Special Reference to the Biological Sciences*, 1960, McGraw-Hill Book Co., New York, N.Y.).

**[0028]** Results: Regarding phosphatidylcholine uptake, turkey sperm cells incorporated NBD-labeled PC in a dose-dependent manner during the first 12 h of storage. Most spermatozoa showed some level of PC uptake within the first 15 min of storage; however, dose-dependent differences ( $P < 0.05$ ) were evident in the percentage of unlabeled sperm ( $4.3\% \pm 0.2$ , 0.5 mg;  $2.1\% \pm 0.3$ , 2.5 mg;  $0.1\% \pm 0.02$ , 10 mg). For all other time-points, at least 98% of spermatozoa contained labeled PC, including non-viable sperm (FIG. 1). Because the magnitude of fluorescence intensity was higher for non-viable than viable sperm cells, the MnFI from the non-viable (PI-positive) sperm was excluded from further analysis. The MnFI increased sequentially at each time-point in a dose-dependent manner (FIG. 2), with a substantial increase in MnFI surprisingly evident at 24 h compared to all other time-points ( $P < 0.05$ ). For each PC treatment, a 2-fold increase in MnFI surprisingly occurred at 3 h of storage with 5 mg PC, and at 2.5 h of storage with 2.5 and 10 mg PC. At 4 h and 8 h of storage in 2.5 mg PC, surprisingly there were 3 and 4-fold increases in MnFI, whereas these same fold



increases occurred at 6 h and 12 h, respectively, for the 0.5 and 10 mg PC treatments. At 24 h of storage, surprisingly the MnFI increased 7.8-fold for the 0.5 mg PC treatment, 9.2-fold for the 2.5 mg PC treatment, and 6.7-fold for the 10 mg PC treatment.

**[0029]** Fertility Evaluation: The mean fertility rate of eggs during the 12-wk insemination trial from control hens inseminated with fresh, non-stored semen was 91.4%±13.4. In contrast, the mean fertility rate of eggs from hens inseminated with 24 h-stored control (0 mg/ml PC) semen was 33.5%±4.5. Weekly fertility rates from this group remained stable ( $p>0.05$ ) for the first 8 wks of egg production, and then declined sharply from 9-12 wks of egg production (FIG. 3). Supplementation of the extender with 0.5, 2.5 or 10.0 mg/ml PC surprisingly improved ( $p<0.05$ ) the fertility rates of stored semen during the first 7 wks of egg production; however, the fertility rates obtained from the 10 mg/ml PC treatment varied widely during egg production (FIG. 3). Lower fertility rates ( $p<0.05$ ) occurred in the 10 mg/ml PC treatment than the 0.5 or 2.5 mg/ml PC treatments at 1, 2, 8, 10, 11, and 12 wks. Fertility rates from the 0.5 and 2.5 mg/ml PC treatments were similar ( $p>0.05$ ) throughout egg production except for wks 7 and 12, where the fertility of the 2.5 mg/ml PC treatment was higher ( $p<0.05$ ). Surprisingly more hens inseminated with the 2.5 mg/ml PC treatment produced 100% fertile eggs during the first 7 wks of egg production ( $p<0.05$ ) than any other stored semen treatment (FIG. 4A). Interestingly, 55-62% of hens inseminated with control stored semen produced 100% fertile eggs during the first 2 wks of egg production; however, by the third wk of production, less than 20% of hens were yielding all fertile eggs. Conversely, by the seventh wk of production, 76% of hens inseminated with control stored semen were not producing any fertile eggs (FIG. 4B). Higher ( $p<0.05$ ) fertility rates were surprisingly obtained with semen stored in the presence of 0.5 mM ZnCl<sub>2</sub> than 5.0 or 50 mM ZnCl<sub>2</sub> (FIG. 5).

**[0030]** Discussion: It has been long recognized that the ability to store turkey semen for 24 h in vitro without a significant loss in fertility upon insemination would benefit the commercial turkey industry. Using a systematic approach of identifying why and how turkey sperm lose functional competence during semen storage at 4° C., I have shown that lipid peroxidation is a major contributor to the lower fertility rates associated with stored semen. Moreover, it also has been demonstrated that the use of antioxidants in extenders does not limit the degree of lipid peroxidation during in vitro storage. Here, I present a novel supplement for turkey semen extender, phosphatidylcholine, which appears to counteract the damaging effects of lipid peroxidation.

**[0031]** My results demonstrated that turkey sperm membranes will incorporate exogenous phosphatidylcholine from the semen extender. During the first 12 h of in vitro storage, turkey sperm cells incorporated phosphatidylcholine in a dose-dependent manner. Most interesting was the dramatic increase in phosphatidylcholine uptake that occurred between 12 and 24 h of storage, with the 2.5 mg dose providing the largest fold increase.

**[0032]** Despite the initial dose-response relationship between concentration and membrane incorporation of phosphatidylcholine, this trend was not evident in the fertilizing ability of stored semen. Although superior to unsupplemented stored semen, use of 10 mg/ml phosphatidylcholine provided less predictable fertility than the other concentrations evaluated. My data suggests that either 0.5 or 2.5 mg/ml

of phosphatidylcholine surprisingly improved the fertility of stored turkey semen during the first 12 wks of egg production. Further, without being bound by theory, the use of zinc to suppress sperm metabolism and motility appeared to mimic the internal environment of the hen's sperm storage tubules, and surprisingly provided another strategy to improve the fertility of turkey semen held for 24 h in vitro.

**[0033]** All of the references cited herein are incorporated by reference in their entirety. Also incorporated by reference in their entirety are the following references: Calif. Agric., Aug. 15, 1970; Poultry Sci., 56: 1054-1056 (1977); J. Reprod. Fert., 13: 571-575 (1967); J. Reprod. Fert., 57: 149-155 (1979); Poultry Sci., 56: 1443-1446 (1977); Beltsville Symposium in Agricultural Research No. 3, Animal Reproduction, 1979, Chapter 12, pg. 161; Bakst, M. R., Reprod. Fert. Dev., 5: 595-599 (1993); Bakst, M. R., J. Appl. Poult. Res., 2: 373-377 (1993); Blesbois, E., et al., Theriogenology, 52: 325-334 (1999); Breque, C., et al., Mol. Reprod. Dev., 66: 314-23 (2003); Burrows, W. H., and J. P. Quinn, Poultry Sci., 14: 251-254 (1937); Cecil, H. C., and M. R. Bakst, Poultry Sci., 72: 1370-1378 (1993); Cerolini, S., et al., Poult. Avian Biol. Rev., 8: 141-148 (1997); Donoghue, A. M., and G. J. Wishart, Anim. Reprod. Sci., 62: 213-232 (2000); Douard, V., et al., Biology of Reproduction, 63: 1450-1466 (2000); Douard, V., et al., Theriogenology, 9: 753-64 (2003); Douard V., et al., Theriogenology, 61: 1-13 (2004); Evans, R. W., and B. P. Setchell, J. Reprod. Fert., 53: 357-62 (1978); Fujihara, N., and B. Howarth, Jr., Poultry Sci., 57: 1766-1768 (1978); Giesen, A. F., and T. J. Sexton, Poultry Sci., 62: 379-381 (1982); Jones, R., and T. Mann, Proc. R. Soc. Lond. (Biol), 193: 317 (1976); Lake, P., Cryobiology, 15: 365-366 (1978); Lake, P. E., and O. Ravie, J. Reprod. Fert., 57: 149-155 (1979); Long, J. A., and M. Kramer, Poultry Sci., 82: 1802-7 (2003); Parks, J. E., and D. V. Lynch, Cryobiology, 29: 255-266 (1992); Scott, T. W., J. Reprod. Fert. Suppl., 18: 65-76 (1973); Sexton, T. J., Comp. Biochem. Physiol., 48B: 59-65 (1974); Surai, P., et al., Poult. Avian Biol. Rev., 9: 11-23 (1998); Surai, P. F., et al., Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol., 120: 527-33 (1998); Wishart, G. J., Br. Poultry Sci., 22: 445-450 (1981); Wishart, G., J. Reprod. Fert., 66: 457-462 (1982); Wishart, G. J., J. Reprod. Fert., 71: 113-118 (1984); Wishart, G., and L. Carver, Comp. Biochem. Physiol., 79: 453-455 (1984). Also incorporated by reference in its entirety is U.S. Pat. No. 4,329,337.

**[0034]** Thus, in view of the above, the present invention concerns (in part) the following:

**[0035]** A medium (for extending the fertility of poultry (e.g., turkey) semen or for preserving poultry semen) for up to about 24 hours when held in vitro at about 5° to about 10° C.) comprising (or consisting essentially of or consisting of) dipotassium phosphate, sodium glutamate, fructose, sodium acetate, mono-potassium phosphate, potassium citrate, magnesium chloride, N-tris hydroxymethyl methyl-2-aminoethane sulfonic acid, phosphatidylcholine, and zinc, and optionally at least one member selected from the group consisting of sialic acid, carnitine, serine ethanalamine phosphodiesterase, and mixtures thereof.

**[0036]** The above medium in a mixture with turkey semen containing live spermatozoa.

**[0037]** The above medium further comprising water. The above medium, said medium containing about 12.7 g/L of potassium diphosphate 3H<sub>2</sub>O, about 8.67 g/L of sodium glutamate, about 5 g/L of anhydrous fructose, about 4.3 g/L of sodium acetate 3H<sub>2</sub>O, about 1.95 g/L of N-tris hydroxym-

ethyl methyl-2-aminoethane sulfonic acid, about 0.64 g/L of potassium citrate, about 0.65 g/L potassium monophosphate, about 0.34 g/L of magnesium chloride 6H<sub>2</sub>O, about 0.5-2.5 mg/ml phosphatidylcholine, and about 0.01 to 0.41 g/L source of zinc.

**[0038]** The above medium, said medium containing less than about 10 mg/ml phosphatidylcholine but more than 0 mg/ml phosphatidylcholine (e.g., about 0.5 to less than about 10 mg/ml phosphatidylcholine or about 0.5 to less than 10 mg/ml phosphatidylcholine).

**[0039]** The above medium, said medium containing about 0.5 to about 2.5 mg/ml (e.g., 0.5 to 2.5 mg/ml) of phosphatidylcholine.

**[0040]** The above medium, wherein said medium does not contain phosphatidylethanolamine. The above medium, wherein said medium does not contain sphingomyelin. The above medium, wherein said medium does not contain phosphatidylserine. The above medium, wherein said medium does not contain phosphatidylinositol. The above medium, wherein said medium does not contain folic acid. The above medium, wherein said medium does not contain vitamin B12. The above medium, wherein said medium does not contain lecithin. The above medium, wherein said medium does not contain surfactants.

**[0041]** A method for extending the fertility of poultry (e.g., turkey) semen (or a method for preserving poultry semen) for up to about 24 hours when held in vitro at about 5° to about 10° C., said method comprising (or consisting essentially of or consisting of) mixing poultry (e.g., turkey) semen containing live spermatozoa with an aqueous medium comprising (or consisting essentially of or consisting of) di-potassium phosphate, sodium glutamate, fructose, sodium acetate, mono-potassium phosphate, potassium citrate, magnesium chloride, N-tris hydroxymethyl methyl-2-aminoethane sulfonic acid, phosphatidylcholine, and zinc, and optionally at least one member selected from the group consisting of sialic acid, carnitine, serine ethanolamine phosphodiesterase, and mixtures thereof.

**[0042]** The above method, wherein said semen is collected from a plurality of male birds directly into said aqueous medium in a container and the mixture of semen and medium after storage in said container is used to inseminate a plurality of female birds.

**[0043]** Other embodiments of the invention will be apparent to those skilled in the art from a consideration of this specification or practice of the invention disclosed herein. It is intended that the specification and examples be considered as exemplary only, with the true scope and spirit of the invention being indicated by the following claims.

I claim:

1. A medium comprising di-potassium phosphate, sodium glutamate, fructose, sodium acetate, mono-potassium phosphate, potassium citrate, magnesium chloride, N-tris hydroxymethyl methyl-2-aminoethane sulfonic acid, phosphatidylcholine, and zinc, and optionally at least one member selected from the group consisting of sialic acid, carnitine, serine ethanolamine phosphodiesterase, and mixtures thereof.

2. The medium according to claim 1 in admixture with water and poultry semen containing live spermatozoa.

3. The medium according to claim 1 in admixture with water and turkey semen containing live spermatozoa.

4. The medium according to claim 1, further comprising water.

5. The medium according to claim 4, said medium containing about 12.7 g/L of potassium diphosphate 3H<sub>2</sub>O, about 8.67 g/L of sodium glutamate, about 5 g/L of anhydrous fructose, about 4.3 g/L of sodium acetate 3H<sub>2</sub>O, about 1.95 g/L of N-tris hydroxymethyl methyl-2-aminoethane sulfonic acid, about 0.64 g/L of potassium citrate, about 0.65 g/L potassium monophosphate, about 0.34 g/L of magnesium chloride 6H<sub>2</sub>O, about 0.5-2.5 mg/ml phosphatidylcholine, and about 0.01 to 0.41 g/L zinc.

6. The medium according to claim 4, said medium containing 12.7 g/L of potassium diphosphate 3H<sub>2</sub>O, 8.67 g/L of sodium glutamate, 5 g/L of anhydrous fructose, 4.3 g/L of sodium acetate 3H<sub>2</sub>O, 1.95 g/L of N-tris hydroxymethyl methyl-2-aminoethane sulfonic acid, 0.64 g/L of potassium citrate, 0.65 g/L potassium monophosphate, 0.34 g/L of magnesium chloride 6H<sub>2</sub>O, 0.5-2.5 mg/ml phosphatidylcholine, and 0.01 to 0.41 g/L zinc.

7. The medium according to claim 4, said medium containing less than about 10 mg/ml phosphatidylcholine.

8. The medium according to claim 4, said medium containing about 0.5 to about 2.5 mg/ml of phosphatidylcholine.

9. The medium according to claim 4, said medium containing about 0.04 to 0.14 g/L zinc.

10. The medium according to claim 4, said medium containing about 0.05 to 0.1 g/L zinc.

11. The medium according to claim 4, said medium containing about 0.07 g/L zinc.

12. A method for extending the fertility of poultry semen for up to about 24 hours when held in vitro at about 5° to about 10° C., said method comprising mixing poultry semen containing live spermatozoa with an aqueous medium comprising di-potassium phosphate, sodium glutamate, fructose, sodium acetate, mono-potassium phosphate, potassium citrate, magnesium chloride, N-tris hydroxymethyl methyl-2-aminoethane sulfonic acid, phosphatidylcholine, and zinc, and optionally at least one member selected from the group consisting of sialic acid, carnitine, serine ethanolamine phosphodiesterase, and mixtures thereof.

13. The method of claim 12, wherein said semen is collected from a plurality of male birds directly into said aqueous medium in a container and the mixture of semen and medium after storage in said container is used to inseminate a plurality of female birds.

14. The method of claim 12, wherein said poultry semen is from turkeys.

15. The method of claim 12, wherein the mixture of said semen and said aqueous medium is stored at about 5° to about 10° C.

\* \* \* \* \*

# NeXcell

POULTRY SEMEN HIGH PROTECTION MEDIUM



EFFICIENCY  
FLEXIBILITY  
SERENITY

Antibiotic-free

Ref : 025018



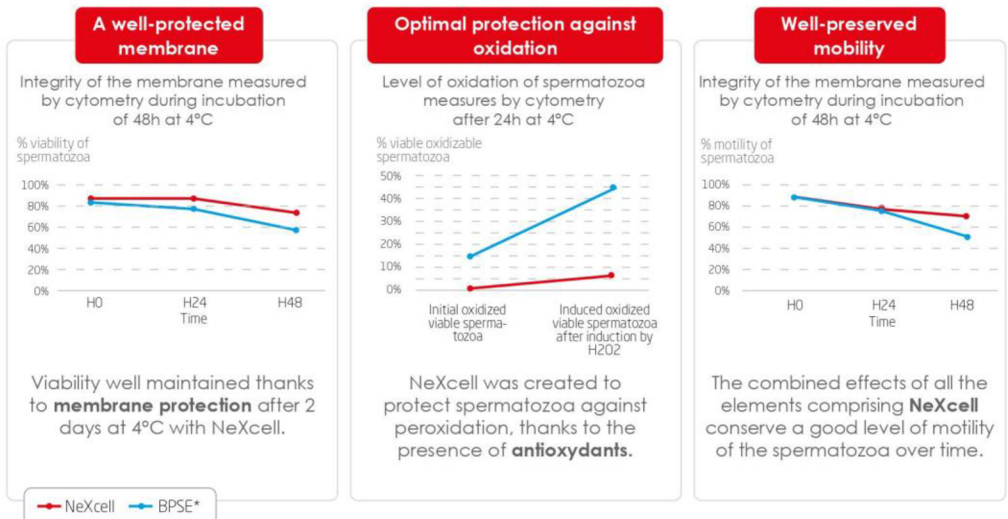
IMV TECHNOLOGIES. FOR LIFE.

# NeXcell:

IMV Technologies has developed a new poultry semen storage medium formulation which is **antibiotic-free**. This medium contains different molecules such as **antioxidants** and **membrane protection** to maintain the viability and functional state of the spermatozoa.

This medium therefore provides the best spermatozoa protection for fresh or stored semen for inseminations.

## Well-protected spermatozoa ...



\*BPSE: Beltsville Poultry Semen Extender

## ...for optimal fertility results from fresh or stored semen.

Example of stored semen - % hatching / fertility



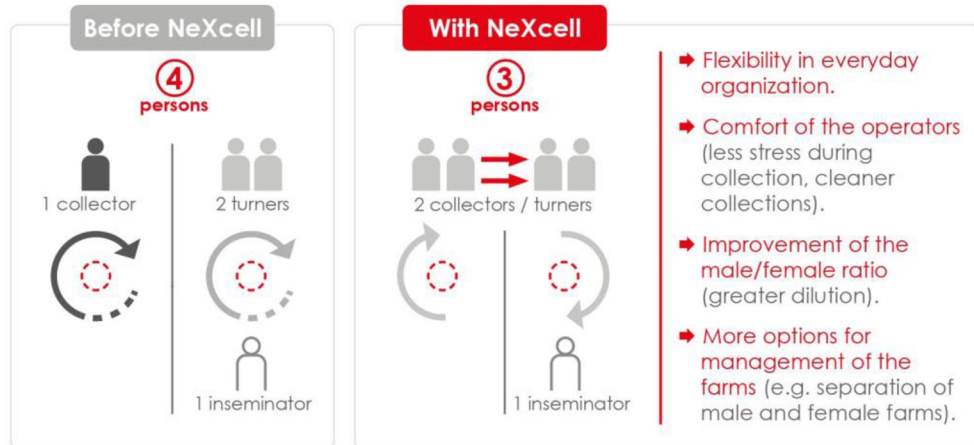
Level of performance maintained after 6h at 4°C. Inseminations made with a 3-person rather than a 4-person team.

— IMV 30mins Ambient temperature  
— NeXcell 6h 4°C  
n=2700 Nicholas females, 250,000 incubated eggs, Italy



## EFFICIENCY - FLEXIBILITY - SERENITY

Requires 1 less person per stored semen insemination workstation



After having tried out NeXcell, they use it for fresh and stored semen!



**GRIMAUD FRÈRES**  
Prendre soin de la vie

Testimony of Robert Wehrlen,  
Palmiped Breeding Technical Director

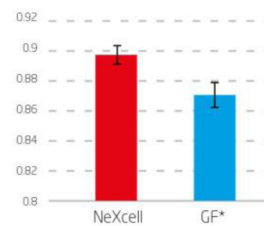
“ The Nexcell **secures the performance level** by smoothing results regardless of the events that may arise during a production cycle.

The NeXcell is easy to use and has allowed us to simplify our semen conditioning and preparation procedures.

Right from the first stored semen test we witnessed **improved fertility** of the eggs, mainly a reduction in the percentage of unfertilized eggs.

For stored semen use of the **NeXcell medium has reduced the reduction in fertility** seen on days D+3 and D+4 after AI. It probably improves storage and the release of spermatozoa in the utero-vaginal glands. We now use the **NeXcell for all our production** i.e. for **stored semen** but also for **fresh semen**. ”

Fertility



\*GF: Grimaud Frères





#### **IMV Technologies France**

ZI n°1 Est - 61300 L'Aigle  
+33 (0) 2 33 34 64 64  
www.imv-technologies.com  
contact@imv-technologies.com

#### **IMV Technologies U.S.A.**

11725 95th Avenue North  
Maple Grove, MN 55369  
+1 763 488 1881  
www.imv-technologies.com  
contact@imvusa.com

#### **IMV Technologies China**

Room 402-23, Building 1,  
No. 800 Naxian Road,  
Zhangjiang, Pudong District,  
200122 - Shanghai, China  
+86 21 50586918 or 50586948  
www.imvchina.com  
contact@imvchina.com

#### **IMV Technologies do Brasil**

Rua Vitoriano dos Anjos 1081  
13041-317 Vila Joao Jorge  
Campinas  
+55 19 2513 3444  
www.imv-technologies.com  
contato@imvbrasil.com.br

#### **IMV Technologies India**

Plot No 750 Phase V, Udyog Vihar  
Gurgaon 122016 (Haryana)  
+91 124 400 44 30  
www.imv-technologies.com  
contact@imvindia.com

#### **IMV Technologies Netherlands**

Pallasweg 22  
8938 AS Leeuwarden  
+31 58 2123279  
www.nifa.nl  
info@nifa.nl

[www.imv-technologies.com](http://www.imv-technologies.com)



## Bird Semen Extender: Raptac

***Raptac makes artificial insemination of birds successful.***

### **Product Details**

For artificial insemination in animal breeding the semen is treated with a suitable nutrient solution to keep spermatozoa functional and if necessary clear it of impurities. We've analyzed the metabolism of sperm to develop nutrient solutions for specific breeds.

**Raptac** has been used successfully in hawkbreeding for several years now. A solution specially developed for the preservation of raptor semen. Also used successfully with other birds of prey, pigeons and small birds (e.g. quail). One box contains 10 ampoules, each filled with 2ml Raptac. The solution is sterile and contains no antibiotics.

The semen extender is colored red. The intensive color promotes homogeneous mixing of semen and extender. Specifications and purity of our products is reviewed carefully. Raptac can be stored for at least 2 years at 4° to 25° C without losing its effectiveness. Diluted semen should not be stored for more than 8 hours.



## Příloha IV: Použití CellROX

- Optional:* You can stain the cells with NucBlue™ Live Cell Stain, a nuclear counterstain, or another counterstain at this time.
- Optional:* If you are using the CellROX® Green Reagent, you can permeabilize the cells with 0.5% Triton® X-100 for 10 minutes, if cell permeabilization is required for multiplexing with another reagent.

Alternatively, you can use the Image-iT® Fixation/Permeabilization Kit (Cat. no. R37602) to fix and permeabilize the cells.

## References

1. Trends Biochem Sci 35, 505 (2010); 2. Oxid Med Cell Longev 2, 259 (2010); 3. Free Rad Res 10, 1239 (2010).

## Product List

Current prices may be obtained at [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com) or from our Customer Service Department.

Catalog no.	Product Name	Unit Size
C10422	CellROX® Deep Red Reagent *for oxidative stress detection*	5 × 50 µL
C10443	CellROX® Orange Reagent *for oxidative stress detection*	5 × 50 µL
C10444	CellROX® Green Reagent *for oxidative stress detection*	5 × 50 µL
C10448	CellROX® Reagent Variety Pack *for oxidative stress detection*	1 kit

### Related Products

A14291DJ	Live Cell Imaging Solution	500 mL
C10423	CellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent *2 mM solution in DMSO*	100 µL
C6827	CM-H <sub>2</sub> DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl- 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester) *mixed isomers* *special packaging*	5 × 50 µg
D399	H <sub>2</sub> DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)	100 mg
D11347	dihydroethidium (hydroethidine) *special packaging*	10 × 1 mg
D23844	DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino- 2',7'-difluorofluorescein diacetate) *special packaging*	10 × 50 mg
I10291	Image-iT® DEAD Green™ viability stain	25 µL
I36007	Image-iT® LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit	1 kit
M36008	MitoSOX® Red mitochondrial superoxide indicator *for live-cell imaging*	5 × 50 µg
T10096	ThiolTracker™ Violet (Glutathione Detection Reagent) *for 5 microplates*	each
R37602	Image-iT® Fixation/Permeabilization Kit	1 kit
R37603	BackDrop™ Background Suppressor *for live cells*	1 kit
R37605	NucBlue™ Live Cell Stain *Hoechst 33342 special formulation*	1 kit
R37606	NucBlue™ Fixed Cell Stain *DAPI special formulation*	1 kit

### Related Platforms



Attune® Acoustic Focusing Cytometer  
(Cat. no. 4469120)



Tali® Image-based Cytometer  
(Cat. no. T10796)



FLoId™ Cell Imaging Station  
(Cat. no. 4471136)



## Before Starting

---

### Materials required but not provided

- Cells and culture medium
- Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2–7.6)
- *Optional:* Fixative (i.e., 3.7% formaldehyde in PBS)
- *Optional:* Permeabilization solution (i.e., 0.5% Triton® X-100)

### Caution

DMSO is known to facilitate the entry of organic molecules into tissues. Handle reagents containing DMSO using equipment and practices appropriate for the hazards posed by such materials. Dispose of the reagents in compliance with all pertaining local regulations. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. Always wear suitable laboratory protective clothing and gloves when handling this reagent.

## Experimental Protocols

---

The following protocol was developed with BPAE, HepG2, U-2 OS, and RAW microphage cells with an optimized CellROX® Reagent concentration of 5 µM, but the assay can be adapted for any cell type. Growth medium, cell density, cell type variations, and other factors may influence labeling. In initial experiments, we recommend testing a concentration range of the reagent to determine the optimal experimental conditions and the concentration for your cell type.

The CellROX® Reagents are sensitive to exposure to light and air; care should be taken not to keep the vials open for long periods of time. Discard any unused material once the vial is opened.

### CellROX® Reagent Staining and Detection

Following protocol for staining cells can be adapted for CellROX® Deep Red, CellROX® Orange, and CellROX® Green Reagents, but specific conditions should be determined separately for each reagent.

1. Treat the cells with the test compound or drug and incubate for the recommended time.

**Note:** You do not need to remove the medium after test compound or drug treatment.

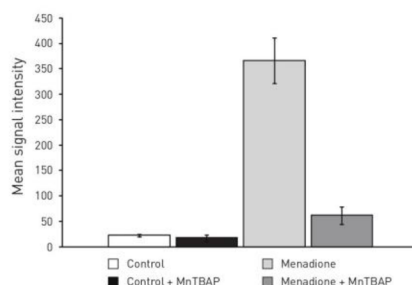
2. Add the CellROX® Reagent at a final concentration of 5 µM to the cells and incubate for 30 minutes at 37°C.
3. Remove medium and wash cells three times with PBS.
4. *Optional:* If you are using the CellROX® Deep Red or the CellROX® Green Reagent, you can preserve the cells with a formaldehyde-based fixative at this stage. Fixation with 3.7% formaldehyde for 15 minutes is recommended. Analyze the signal within 24 hours for the CellROX® Green Reagent and within 2 hours for the CellROX® Deep Red Reagent.

**Note:** You can use the Live Cell Imaging Solution (Cat. no A14291DJ) to keep the cells healthier during analysis with longer duration.

**Figure 3** Quantitation and statistical analysis of oxidative stress based on staining with CellROX® Oxidative Stress Reagents (\*\*a = The values are significantly different from controls with  $P \leq 0.0001$ ; \*\*b = values were significantly different from drug treated cells with  $P \leq 0.0001$ ).

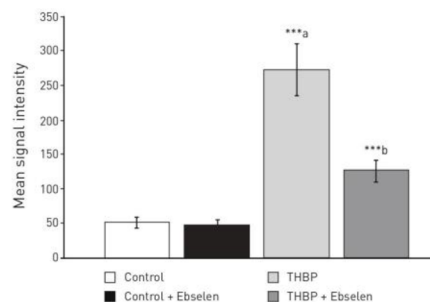
**(A) CellROX® Deep Red Reagent.** Bovine pulmonary artery endothelial (BPAE) cells were plated in a 96-well plate. The cells were treated with or without 100  $\mu\text{M}$  of menadione for 1 hour at 37°C. 100  $\mu\text{M}$  of superoxide scavenger, MnTBAP, was added to some of the control and menadione-treated wells for the last 30 minutes of incubation. The cells were then stained with 5  $\mu\text{M}$  of CellROX® Deep Red Reagent and Hoechst 33324 by adding the probe to the complete medium and incubating the cells at 37°C for 30 minutes. The cells were then washed with PBS and analyzed on a Thermo Fisher Cellomics ArrayScan® VTI.

A



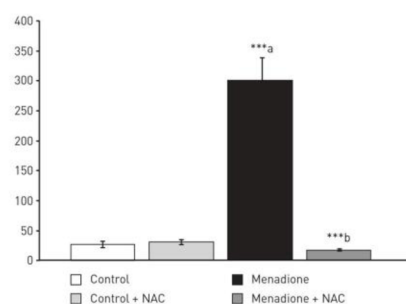
**(B) CellROX® Orange Reagent.** Bovine pulmonary artery endothelial (BPAE) cells were plated in 96-well plates. The cells were treated with or without 200  $\mu\text{M}$  of tert-butyl hydroperoxide (TBHP) for 2 hours at 37°C. 10  $\mu\text{M}$  of ebselen was added to some of the control and TBHP-treated wells. The cells were then stained with 5  $\mu\text{M}$  of CellROX® Orange Reagent and Hoechst 33342 by adding the probe to the complete medium and incubating the cells at 37°C for 30 minutes. The cells were then washed with PBS and analyzed on a Thermo Fisher Cellomics ArrayScan® VTI. Ebselen treatment inhibited ROS caused by TBHP, confirming that the signal was due to ROS induced by the compound.

B

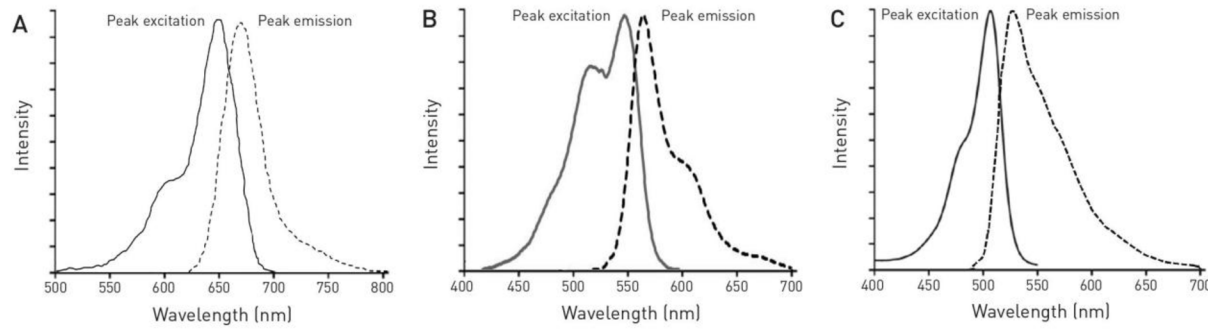


**(C) CellROX® Green Reagent.** Bovine pulmonary artery endothelial (BPAE) cells were plated on glass bottom 35-mm MaTek dishes. BPAE cells were treated with or without 100  $\mu\text{M}$  menadione for 1 hour at 37°C. 50  $\mu\text{M}$  N-acetyl cysteine was added to some of the control and menadione-treated wells. The cells were then stained with 5  $\mu\text{M}$  CellROX® Green Reagent and Hoechst 33342 by adding the probe to the complete media and incubating at 37°C for 30 minutes. The cells were then washed with PBS and then imaged on a Zeiss Axiovert inverted microscope using a 40X objective. N-acetyl cysteine treatment inhibited ROS caused by TBHP, confirming that the signal was due to ROS induced by the compound.

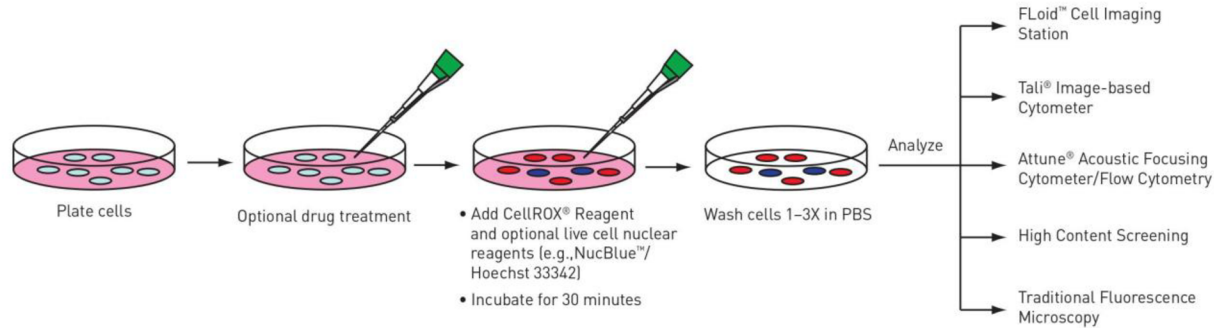
C



**Figure 1** Fluorescence excitation and emission spectra of the oxidized CellROX® Oxidative Stress Reagents. **(A)** CellROX® Deep Red Reagent, **(B)** CellROX® Orange Reagent, **(C)** CellROX® Green Reagent.



**Figure 2** Workflow for CellROX® Oxidative Stress Reagents.



**Table 2** Comparison between ROS detection methods

	CellROX® Deep Red Reagent	CellROX® Orange Reagent	CellROX® Green Reagent	H <sub>2</sub> -DCFDA*	Dihydroethidium (DHE)
Live cell compatible	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Labeling in complete medium	Yes	Yes	Yes	No	Yes
Formaldehyde fixable	Yes	No	Yes	No	No
Detergent resistant	No	No	Yes	No	No
Compatible platforms	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Imaging</li> <li>• HCS†</li> <li>• HTS‡</li> <li>• Flow cytometry</li> <li>• Attune® Acoustic Focusing Cytometer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Imaging</li> <li>• HCS</li> <li>• Flow cytometry</li> <li>• Tali® Image-based Cytometer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Imaging</li> <li>• HCS</li> <li>• HTS</li> <li>• Flow cytometry</li> <li>• Tali® Image-based Cytometer</li> <li>• FLOID™ Cell Imaging Station</li> <li>• Attune® Acoustic Focusing Cytometer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Imaging</li> <li>• HCS</li> <li>• HTS</li> <li>• Flow cytometry</li> <li>• FLOID™ Cell Imaging Station</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Imaging</li> <li>• HCS</li> </ul>

\* H<sub>2</sub>-DCFDA: Dihydrodichlorofluorescein, diacetate; † High-content screening; ‡ High-throughput screening.

## CellROX® Oxidative Stress Reagents

Catalog nos. C10422, C10443, C10444, C10448

**Table 1** Contents and storage

Material	Catalog no.	Amount	Excitation/Emission	Concentration	Storage*
CellROX® Deep Red Reagent	C10422	5 × 50 µL	640/665 nm (Deep Red)	2.5 mM stabilized solution in DMSO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ≤-20°C</li> <li>• Protect from light</li> <li>• Desiccate</li> </ul>
CellROX® Orange Reagent	C10443		545/565 (Orange)		
CellROX® Green Reagent	C10444		485/520 (Green)		
CellROX® Variety Pack	C10448	1 × 50 µL CellROX® Deep Red Reagent 1 × 50 µL CellROX® Orange Reagent 1 × 50 µL CellROX® Green Reagent			

\*When stored as directed, the product is stable for 6 months from the date of receipt.

### Introduction

CellROX® Oxidative Stress Reagents are fluorogenic probes designed to reliably measure reactive oxygen species (ROS) in live cells. The cell-permeable reagents are non-fluorescent or very weakly fluorescent while in a reduced state and upon oxidation exhibit strong fluorogenic signal. CellROX® Green Reagent is a DNA dye, and upon oxidation, it binds to DNA; thus, its signal is localized primarily in the nucleus and mitochondria. In contrast, the signals from CellROX® Deep Red and CellROX® Orange Reagents are localized in the cytoplasm. The fluorescence resulting from CellROX® Oxidative Stress Reagents can be measured using traditional fluorescence microscopy, high-content imaging and analysis, microplate fluorometry, or flow cytometry. These reagents can be detected using the appropriate benchtop instrument such as the Attune® Acoustic Focusing Cytometer, Tali® Image-based Cytometer, and FLoid™ Cell Imaging Station (See Table 2, page 2).

The staining workflow is simple (Figure 2, page 2), and the reagent can be applied to cells in complete growth medium or buffer. All of the CellROX® Oxidative Stress Reagents are very photostable when compared to traditional ROS detection dyes. In addition, some of the reagents retain their signal after formaldehyde fixation and detergent permeabilization (Table 2, page 2), allowing for assay flexibility and improved workflows compared to those based on classic dyes for ROS detection.

CellROX® Oxidative Stress Reagents specifically detect ROS as shown by inhibition of menadione-induced ROS in endothelial cells (Figure 3, page 3). These probes have been used to evaluate ROS generated by various agents, including lipopolysaccharide, menadione, angiotensin II, and nefazodone in several different live-cell models.

## Purchaser Notification

### Corporate Headquarters

5791 Van Allen Way  
Carlsbad, CA 92008  
USA  
Phone: +1 760 603 7200  
Fax: +1 760 602 6500  
Email: techsupport@lifetech.com

### European Headquarters

Inchinnan Business Park  
3 Fountain Drive  
Paisley PA4 9RF  
UK  
Phone: +44 141 814 6100  
Toll-Free Phone: 0800 269 210  
Toll-Free Tech: 0800 838 380  
Fax: +44 141 814 6260  
Tech Fax: +44 141 814 6117  
Email: euroinfo@invitrogen.com  
Email Tech: eurotech@invitrogen.com

### Japanese Headquarters

LOOP-X Bldg. 6F  
3-9-15, Kaigan  
Minato-ku, Tokyo 108-0022  
Japan  
Phone: +81 3 5730 6509  
Fax: +81 3 5730 6519  
Email: jpinfo@invitrogen.com

Additional international offices are listed at  
[www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)

These high-quality reagents and materials must be used by, or directly under the supervision of, a technically qualified individual experienced in handling potentially hazardous chemicals. Read the Safety Data Sheet provided for each product; other regulatory considerations may apply.

### Obtaining Support

For the latest services and support information for all locations, go to [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com).

At the website, you can:

- Access worldwide telephone and fax numbers to contact Technical Support and Sales facilities
- Search through frequently asked questions (FAQs)
- Submit a question directly to Technical Support ([techsupport@lifetech.com](mailto:techsupport@lifetech.com))
- Search for user documents, SDSs, vector maps and sequences, application notes, formulations, handbooks, certificates of analysis, citations, and other product support documents
- Obtain information about customer training
- Download software updates and patches

### SDS

Safety Data Sheets (SDSs) are available at [www.lifetechnologies.com/sds](http://www.lifetechnologies.com/sds).

### Certificate of Analysis

The Certificate of Analysis provides detailed quality control and product qualification information for each product. Certificates of Analysis are available on our website. Go to [www.lifetechnologies.com/support](http://www.lifetechnologies.com/support) and search for the Certificate of Analysis by product number, which is printed on the product packaging (tube, pouch, or box).

### For Research Use Only. Not intended for diagnostic procedures.

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION AND/OR ITS AFFILIATE(S) DISCLAIM ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR NON-INFRINGEMENT. TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, IN NO EVENT SHALL LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION AND/OR ITS AFFILIATES MAKE NO REPRESENTATION WHATSOEVER THAT SERVICES PROVIDED BY LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATES SATISFY OR WILL SATISFY ANY REQUIREMENTS OF ANY GOVERNMENTAL BODY OR OTHER ORGANIZATION, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, ANY REQUIREMENT OF THE UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION OR THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. CUSTOMER AGREES THAT IT IS CUSTOMER'S RESPONSIBILITY TO ENSURE THAT SUCH SERVICES ARE ADEQUATE TO MEET ITS REGULATION/CERTIFICATION REQUIREMENTS AND THAT ALL REQUIREMENTS OF ANY GOVERNMENTAL BODY OR OTHER ORGANIZATION, INCLUDING, BUT NOT LIMITED TO, ANY REQUIREMENT OF THE UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION OR THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION ARE THE RESPONSIBILITY OF THE CUSTOMER.

### Limited Warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at [www.lifetechnologies.com/termsandconditions](http://www.lifetechnologies.com/termsandconditions). If you have any questions, please contact Life Technologies at [www.lifetechnologies.com/support](http://www.lifetechnologies.com/support).

### Limited Use Label License: Research Use Only

The purchase of this product conveys to the purchaser the limited, non-transferable right to use the purchased amount of the product only to perform internal research for the sole benefit of the purchaser. No right to resell this product or any of its components is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for internal research purposes only and is not for use in commercial services of any kind, including, without limitation, reporting the results of purchaser's activities for a fee or other form of consideration. For information on obtaining additional rights, please contact [outlicensing@lifetech.com](mailto:outlicensing@lifetech.com) or Out Licensing, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.

The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.

ArrayScan® is a registered trademark of Cellnomics, Inc.

©2012 Life Technologies Corporation. All rights reserved.

*life*  
technologies™

# ČZU-N2

## Kompletní krmivo pro užitkové nosnice

### Složení:

Pšenice, sojový extrahovaný šrot(GMO), kukuřice, uhličitan vápenatý, otruby pšeničné, ječmen, vojtěškové úsušky, rostlinný olej-řepkový, dihydrogenfosforečnan vápenatý, chlorid sodný, hydrogenuhličitan sodný, pšeničná mouka krmná.  
Toto krmivo obsahuje GMO.

### Analytické složení v 1kg:

Hrubý protein	15,0 %
Hrubá vláknina	3,8 %
Hrubé oleje a tuky	3,7 %
Hrubý popel	11,5 %
Vápník	3,7 %
Fosfor	0,51 %
Sodík	0,15 %
Lysin	0,76 %
Methionin	0,34 %

### Nutriční doplňkové látky v 1kg:

#### Vitamíny:

3a672a Vitamin A	8250 mj
3a671 Vitamin D3	2352 mj

#### Stopové prvky:

3b103 Síran železnatý monohydrát , jako železo	130 mg
3b603 Oxid zinečnatý , jako zinek	82 mg
3b405 Síran měďnatý pentahydrát , jako měď	13 mg
3b502 Oxid manganatý, jako mangan	101 mg
3b201 Jodid draselný, jako jód	0,94 mg
3b801 Seleničitan sodný , jako selen	0,27 mg

### Technologické doplňkové látky v 1kg:

#### Antioxidanty:

E321 Butylhydroxytoluen 5,4978 mg, E320 Butylhydroxyanisol 1,0995 mg

Senzorické doplňkové látky: E161g Kantaxantin 1,998 mg, E161b Lutein 3,201 mg

### Krmný návod:

Kompletní krmná směs je určena pro užitkové nosnice. Zkrmuje se cca 10dkg na kus a den dle technologického postupu daného genotypu při dostatku pitné vody. Skladujte v suchu na dřevěných paletách.

Výrobce:

**Sehnoutek a synové s.r.o.**

Voleč 143, 53341 Voleč

Schvalovací identifikační číslo provozu: α CZ 800465-01

Ošetřeno proti plísním

Datum výroby/Číslo šarže : 4.1.2022/ 48335

Minimálně trvanlivé do : 4 měsíce od data výroby

Hmotnost : 25kg