

## Formulár ZK - Záverečná karta projektu

Riešiteľ: prof. Ing. Peter Chrenek, DrSc.	Evidenčné číslo projektu: LPP-0119-09
Názov projektu: Magnetická separácia živočíšnych buniek pre využitie v biomedicínskej a poľnohospodárskej oblasti	

Na ktorých pracoviskách bol projekt riešený:	CVŽV Nitra
Ktoré zahraničné pracoviská spolupracovali pri riešení (názov, štát):	ABC Godollo, Maďarsko, Lekárska univerzita Viedeň, Rakúsko, Lekárska Fakulta, Univerzita Zurich, Švajčiarsko

Udelené patenty alebo podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory vychádzajúce z výsledkov projektu:	
Publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu (uvedte i publikácie prijaté do tlače):  <i>Uvádzajte maximálne päť najvýznamnejších publikácií.</i>	Vasicek J., Parkanyi V., Ondruska L., Makarevich A., <b>Chrenek P.</b> : Elimination of Apoptotic Spermatozoa from Rabbit Insemination Dose Using Annexin V Associated with the MACS Technique. A Preliminary Study. Folia Biologica
	Vašíček J., Makarevich A., <b>Chrenek P.</b> : Effect of the MACS technique on the rabbit sperm motility. Centr Eur J Biol, 6(6), 2011, 958-962.
	Slamecka J.Jr., <b>Chrenek P.</b> : Rabbit amniotic fluid as a potential source of broadly multipotent stem cell. Slovak J. Anim. Sci., 46, (1), 2013, 11-15.
	SLAMEČKA J JR, BONTOVICS B, MARAGHECHI P, HIRIPI L, MAKAREVIČ AV, CHRENEK P, BOSZE Z, GOCZA E,: Expression pattern of pluripotency markers in rabbit epiblast and embryonic stem cells. Submitted in Mol Biol and Reprod, september 2013.
	<b>Chrenek P.</b> , a kol.: Embryotechnológia. SPU v Nitre a CVŽV Nitra, Garmond Nitra, ISBN 978-80-552-0846-6, 2012, 271 strán.
V čom vidíte uplatnenie výsledkov projektu:	Prvé práce svojho druhu nielen na Slovensku ale aj v okolitých krajinách, výsledky ktorých významne rozširujú poznatky aplikácie živočíšnych kmeňových buniek v poľnohospodárskej ale najmä v biomedicínskej oblasti.

## Charakteristika výsledkov

### Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - slovensky:

Magneticky vyseparované spermie boli potom použité pre umelú insemináciu hormonálne ošetrovaných samic z úmyslom zvýšiť koncepčný pomer a tým zefektívniť chov brojlerových králikov. CASA analýza uskutočnená po MACS separácii spermií odhalila, že podiel apoptotických spermií v ejakuláte Novozélandských bielych králikov sa pohybuje okolo 7 až 20%. Elektronová mikroskopia (TEM) odhalila, že MACS metóda by mohla odstraňovať spermie s poškodenou membránou a uvoľneným akrozomálnym obsahom. Avšak, MACS separácia (v oboch E1 a E2) neovplyvnila reprodukčné ukazovatele samic. Vyvinuli sme médium so známou chemickou kompozíciou (eliminácia variability vyplývajúcej zo séra), ktoré podporuje rast a proliferáciu ľudských AFSC, aj keď ich morfológia a schopnosť proliferácie je narušená oproti médiu obsahujúcom sérum. Identifikovali sme zmes 6 nízkomolekulových inhibítorov diferenciácie a epigenetických modulátorov, ktorá je nielen kompatibilná so zachovaním životaschopnosti AFSC, ale dokonca zvyšuje expresiu dvoch kľúčových markerov embryonálnych kmeňových buniek v AFSC – Nanog a SSEA-4. Ďalej sme získali čiastočne preprogramované indukované kmeňové bunky z AFSC pomocou neintegrujúcich epizomálnych plazmidov, pričom tieto bunky exprimovali Oct4 a Sox2 vo väčšine. Plne preprogramované indukované kmeňové bunky sme získali preprogramovaním AFSC pomocou integrujúcich retrovirálnych vektorov. Epizomálne a takisto retrovirálne preprogramovanie sme dosiahli v klinicky vhodnom médiu s plne charakterizovanou chemickou kompozíciou a bez zvieracích komponentov.

### Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - anglicky:

MACS sorting efficiency was assessed basing on the quality of separated rabbit spermatozoa. Sorted spermatozoa were evaluated *in vitro* in terms of their concentration and motility using computer-assisted sperm analysis (CASA), in terms of the sperm head membranes morphology using transmission electron microscopy (TEM) and in terms of plasma membrane integrity (annexin V/PI/DAPI) using fluorescence microscopy. Magnetic separated spermatozoa were then used for the artificial insemination of hormonally treated does for the purposes of conception rate enhancement, and thus to improve the efficiency of broiler rabbit breeding. The CASA analysis after MACS sperm sorting revealed that proportion of apoptotic spermatozoa in the semen of New Zealand White bucks varied from 7 to 20%. The electron microscopy (TEM) revealed that MACS treatment might eliminate spermatozoa with membrane damages and released acrosomal matter. However, the MACS separation (in both E1 and E2) did not affect the reproductive parameters of rabbit does.

We developed a chemically defined formulation that supports growth and proliferation of human AFSC although their morphology is altered and proliferation rate slower than fetal calf serum-supplemented medium. We identified a unique cocktail of 6 small molecule inhibitors of differentiation and epigenetic modulators that is not only compatible with maintaining viability of AFSC culture but can also upregulate the expression of two of the key pluripotency markers in these cells – Nanog and SSEA-4. We derived partially reprogrammed induced pluripotent stem cells from AFSC using non-integrating episomal plasmid-based reprogramming, expressing Oct4 and Sox2 in most of the cells. We derived fully reprogrammed iPSC from AFSC using integrating retroviral vector-based reprogramming. Both episomal and retroviral reprogramming was achieved in clinically relevant, fully chemically defined xeno-free medium.

**Podpisom záverečnej karty riešiteľ vyjadruje svoj súhlas so zverejnením údajov v nej uvedených.**

Podpis zodp. riešiteľa: .....

Dátum: .....

Podpis štatutárneho zástupcu: .....

Pečiatka: