

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-15-0544****Syntetická biológia - moderná stratégia zlepšovania kvality živočíšnych spermií**Zodpovedný riešiteľ **Ing. Eva Tvrdá, PhD.**Príjemca **Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre - Fakulta biotechnológie a potravinárstva**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

1. Pedagogical University of Kraków, Faculty of Geography and Biology, Institute of Biology, ul. Podchorążych 2, 30-084 Kraków, Poland
2. Department of Food Biotechnology, Faculty of Food Technology, University of Agriculture in Krakow, Balicka 122, 30-149 Krakow, Poland
3. Department of Bioenergetics, Food Analysis and Microbiology, Institute of Food Technology and Nutrition, University of Rzeszow, Cwiklinskiej 1, 35-601 Rzeszow, Poland
4. Department of Bioenergy Technology and Food Analysis, Faculty of Biology and Agriculture, University of Rzeszow, aleja Tadeusza Rejtana 16C, 35-601 Rzeszow, Poland
5. Department of Food Technology of Plant Origin, Poznań University of Life Sciences, 31 Wojska Polskiego St., 60-624 Poznań, Poland
6. National Institute of Chemical Safety, Nagyváradtér 2, H-1450, Budapest, Hungary
7. Institute of Farm Animal Genetics, Friedrich–Loeffler–Institute, Federal Research Institute of Animal Health, Höltysstrasse 10, 31535 Neustadt, Germany
8. Condorcet—Hainaut Provincial High School, Chemin du Champ de Mars 17, 7000 Mons, Belgium
9. Unit of Genetics, Department of Biology, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Darwin 2, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain
10. Clinica Ginemed, C/ Farmaceutico Murillo Herrera, 3, 41010 Sevilla, Spain
11. Department of Applied Physics III, University of Sevilla, C/ San Fernando, 4, 41004 Sevilla, Spain
12. Institute of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia University of Life Sciences and Technologies, K. Helmaņa iela 8, LV-3004 Jelgava, Latvia
13. Research Institute for Physical Chemical Problems, Belarusian State University, Leningradskaya str. 14, 220030 Minsk, Belarus
14. Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, P.O. Box 12, 34000 Kragujevac, Serbia
15. Department of Microbiology and Biotechnology, National University of Uzbekistan, University Street 4, 100174 Tashkent, Uzbekistan
16. Department of Veterinary Sanitary Examination and Hygiene, Faculty of Veterinary Science, Kazakh National Agrarian University, Abai street 8, 050010 Almaty city, Kazakhstan

17. Department of Preclinical Science, Faculty of Medicine, Center of Excellence in Translational Medicine-BIOREN, Universidad de La Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile
18. Division of Medical Physiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Stellenbosch University, Private Bag X1, Matieland, 7602 Stellenbosch, South Africa
19. Department of Health Science, Faculty of Health and Applied Sciences, Namibia University of Science and Technology, 13 Storch Street, Private Bag 13388 Windhoek, Namibia
20. American Center for Reproductive Medicine, Cleveland Clinic, 10681 Carnegie Ave, Cleveland, Ohio 44106, USA

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

Proces prípravy žiadosti o patentovú prihlášku, resp. úžitkový vzor pre semenné extendery SMM Active 1-3 bol spomalený v dôsledku dodatočných in vitro komparatívnych pokusov ako aj in vivo testovania v praktických podmienkach. Príprava podkladov bola súčasne pozastavená v dôsledku COVID-19 pandémie a opatrení zameraných na ochranu zdravia, a očakáva sa, že bude pokračovať po ukončení núdzového stavu.

Členovia riešiteľského kolektívu sa aktuálne venujú vývinu semenného extendera pre boviné spermie s redukovaným obsahom antibiotík a bioaktívnymi suplementami redukujúcimi výskyt kryokapacitačných zmien. Efektívnosť produktu bude otestovaná v spolupráci so Slovenskými biologickými službami, a. s., a v prípade pozitívnych výsledkov je plánované schválenie výrobného patentu na úrovni SR/EÚ.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

VEDECKÉ ČLÁNKY

1. BLASZCZYK, M. – TOPORCEROVA, S. – POPELKOVA, M. – BINKOWSKI, Ł. – SEMLA, M. – TVRDA, E. – LUKAČ, N. – MASSANYI, P. – STAWARZ, R. 2019. Semen metal profile, spermatozoa morphology and semen biochemical parameters in subfertile men with different lifestyle habits. In *Journal of Elementology*, vol. 24, no. 2, p. 603-614. ISSN 1644-2296; IF: 0.71.
2. DURACKA, M. – LUKAC, N. – KACANIOVA, M. – KANTOR, A. – HLEBA, L. – ONDRUSKA, L. – TVRDA, E. 2019. Antibiotics Versus Natural Biomolecules: The Case of In Vitro Induced Bacteriospermia by *Enterococcus Faecalis* in Rabbit Semen. In *Molecules*, vol. 24, no. 23, pii E4329. ISSN 1420-3049; IF: 3,267, citations: 4.
3. ĎURAČKA, M. – DEBACKER, M. – BUČKO, O. – LUKAČ, N. – TVRDA, E. 2019. The effect of kaempferol and naringenin may improve the in vitro quality of stored boar semen. In *Journal of Central European Agriculture*, vol. 20, no. 4., p. 1069-1075. ISSN 1332-9049; citations: 1.
4. GOSALVEZ, J. – TVRDA, E. – AGARWAL, A. 2017. Free radical and superoxide reactivity detection in semen quality assessment: past, present, and future. In *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 34, no. 6, p. 697-707. ISSN 1058-0468; IF: 2.829, citations: 39.
5. JAMBOR, T. – TVRDÁ, E. – TUŠIMOVÁ, E. – KOVÁČIK, A. – BISTÁKOVÁ, J. – FORGÁCS, Z. – LUKÁČ, N. 2017. In vitro effect of 4-nonylphenol on human chorionic gonadotropin (hCG) stimulated hormone secretion, cell viability and reactive oxygen species generation in mice Leydig cells. In *Environmental Pollution*, vol. 222, pp. 219-225. ISSN 0269-7491; IF: 6.792, citations: 22
6. KAČANIOVA, M. – MELLEN, M. – VUKOVIC, N. – KLUZ, M. – PUCHALSKI, C. – HAŠČIK, P. – KUNOVA, S. 2019. Combined effect of vacuum packaging, fennel and savory essential oil treatment on the quality of chicken thighs. In *Microorganisms*, vol. 7, no. 134, pii 5. ISSN 2076-2607; IF: 4.152, citations: 5.
7. KAČÁNIOVÁ, M. – TERENTJEVA, M. – ŠTEFÁNIKOVÁ, J. – ŽIAROVSKÁ, J. – SAVITSKAYA, T. – GRINSHPAN, D.D. – KOWALCZEWSKI, P.Ł. – VUKOVIC, N. – TVRDÁ, E. 2020. Chemical composition and antimicrobial activity of selected essential oils against *Staphylococcus* spp. Isolated from human semen. In *Antibiotics*. vol. 9, no. 11, p. 765-786. ISSN 2079-6382; IF: 3.893.

8. KOLESAR, E. – TVRDA, E. – HALENAR, M. – SCHNEIDGENOVA, M. – CHRASTINOVA, L. – ONDRUSKA, L. – JURCIK, R. – KOVACIK, A. – KOVACIKOVA, E. – MASSANYI, P. – KOLESAROVA, A. 2018. Assessment of rabbit spermatozoa characteristics after amygdalin and apricot seeds exposure in vivo. In *Toxicology Reports*, vol. 5, p. 679-686. ISSN 2214-7500; citations: 4.
9. KOVACIK, A. – TIRPAK, F. – TOMKA, M. – MISKEJE, M. – TVRDA, E. – ARVAY, J. – ANDREJI, J. – SLANINA, T. – GABOR, M. – HLEBA, L. – FIK, M. – JAMBOR, T. – CISAROVA, M. – MASSANYI, P. 2018. Trace elements content in semen and their interactions with sperm quality and RedOx status in freshwater fish *Cyprinus carpio*: A correlation study. In *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 50, p. 399-407. ISSN 0946-672X; IF: 3.245, citations: 9.
10. PAAL, D. – STREJČEK, F. – TVRDA, E. – FORMICKI, G. – KLEIN, S. – RATH, D. – MASSANYI, P. 2018. The in Vitro Effect of Taurine on Boar Spermatozoa Quality. In *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, vol. 66, p. 131-137. ISSN 1211-8516; citations: 1.
11. SLANINA, T. – MIŠKEJE, M. – TIRPAK, F. – BŁASZCZYK, M. – FORMICKI, R. – MASSANYI, P. 2018. Caffeine strongly improves motility parameters of turkey spermatozoa with no effect on cell viability. In *Acta Veterinaria Hungarica*, vol. 66, no. 1, p. 137-150. ISSN 0236-6290; IF: 0.991, citations: 6.
12. SLANINA, T. – MIŠKEJE, M. – TIRPAK, F. – BŁASZCZYK, M. – STAWARZ, R. – MASSANYI, P. 2018. Effect of taurine on turkey (*Meleagris gallopavo*) spermatozoa viability and motility. In *Czech Journal of Animal Science*, vol. 63, p. 127-135. ISSN 1212-1819; IF:0.835, citations: 7.
13. TIRPAK, F. – SLANINA, T. – TOMKA, M. – ZIDEK, R. – HALO, M. Jr. – IVANIC, P. – GREN, A. – FORMICKI, G. – STACHANCZYK, K. – LUKAC, N. – MASSANYI, P. 2019. Exposure to nonionizing electromagnetic radiation of public risk prevention instruments threatens the quality of spermatozoids. In *Reproduction of Domestic Animals*, vol. 54, no. 2, p. 150-159. ISSN 1439-0531; IF: 1.641.
14. TVRDA, E. – ARROYO, F. – ĎURAČKA, M. - LOPEZ-FERNANDEZ, C. – GOSALVEZ, J. 2019. Dynamic assessment of human sperm DNA damage II: the effect of sperm concentration adjustment during processing. In *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 36, no. 4, p. 799-807. ISSN 1058-0468; IF: 2.829, citations: 2.
15. TVRDA, E. – ARROYO, F. – GOSALVEZ, J. 2018. Dynamic assessment of human sperm DNA damage I: the effect of seminal plasma-sperm co-incubation after ejaculation. In *International Urology and Nephrology*, vol. 50, no. 8, p. 1381-1388. ISSN 0301-1623; IF: 1.843, citations: 8.
16. TVRDÁ, E. – DEBACKER, M. – ĎURAČKA, M. – KOVÁČ, J. – BUČKO, O. 2020. Quercetin and naringenin provide functional and antioxidant protection to stored boar semen. In *Animals*, vol. 10, no. 10, p. 1-16. ISSN 2076-2615; IF: 2.323.
17. TVRDÁ, E. – GOSÁLVEZ, J. – ARROYO, F. - SÁNCHEZ-MARTÍN, P. – RAMÓN, D.J.R.D. – RAÚL, S.G. 2020. Dynamic assessment of human sperm DNA damage III: the effect of sperm freezing techniques. In *Cell and Tissue Banking*, Epub ahead of print. ISSN 1389-9333; IF: 1.149.
18. TVRDA, E. – GREIFOVA, H. – MACKOVICH, A. – HASHIM, F. – LUKAČ, N. 2018. Curcumin offers antioxidant protection to cryopreserved bovine semen. In *Czech Journal of Animal Science*, vol. 63, p. 247-255. ISSN 1212-1819; IF:0.835, citations: 6.
19. TVRDA, E. - MACKOVICH, A. - GREIFOVA, H. – HASHIM, F. – LUKAČ, N. 2017. Antioxidant effects of lycopene on bovine sperm survival and oxidative profile following cryopreservation. In *Veterinární Medicína*, vol. 62, no. 8, p. 429-436. ISSN 0375-8427; IF: 0.588, citations: 13.
20. TVRDÁ, E. – MICHALKO, J. – ÁRVAY, J. – VUKOVIC, N. – IVANIŠOVÁ, E. – ĎURAČKA, M. – MATUŠÍKOVÁ, I. – KAČÁNIOVÁ, M. 2020. Characterization of the Omija (*Schisandra chinensis*) extract and its effects on the bovine sperm vitality and oxidative profile during in vitro storage. In *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2020, article ID 7123780. ISSN: 1741-427X; IF: 1.813.
21. TVRDA, E. – STRAKA, P. – GALBAVY, D. – IVANIC, P. 2019. Epicatechin Provides Antioxidant Protection to Bovine Spermatozoa Subjected to Induced Oxidative Stress. In *Molecules*, vol. 24, no. 18, pii: E3226. ISSN 1420-3049; IF: 3.267, citations: 6.

1. KOVÁČIK, A. - TVRDÁ, E. 2020. Research in Animal Physiology. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2020, 106 s. ISBN 978-80-552-2234-9.
2. TVRDÁ, E. – YENISETTI, S C. Animal Models in Medicine and Biology. London: Intech Open, 2020, 345 s. ISBN 978-1-83880-011-6.
3. TVRDA, E. 2018. NBT Test (kapitola vo vedeckej monografii s rozsahom väčším ako 3 autorské hárky). In AGARWAL, A. - SAMANTHA L. - HENKEL, R. Oxidants, Antioxidants, and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction. London: Elsevier, 2018, p. 195-205. ISBN: 978-0-12-812501-4.
4. TVRDÁ, E. 2020. Testicular and prostate cancers (kapitola vo vedeckej monografii s rozsahom väčším ako 3 autorské hárky). In: BALASINOR, N. – PARTE, P. – SINGH, D. (Eds.). Epigenetics and Reproductive Health. London: Academic Press, 2020, s. 271-293. ISBN 978-0-12-819753-0.

Uplatnenie výsledkov projektu

Výstupy projektu poskytujú rozsiahle portfólio moderných protokolov pre identifikáciu a evaluáciu nových markerov kvality živočíšnych spermií ako aj pre primárne spracovanie a manipuláciu ejakulátov cicavčích, vtáčích i plazích živočíšnych druhov. Výsledky projektu súčasne významnou mierou prispeli k vývinu nových semenných extenderov slúžiacich pre krátkodobé a dlhodobé uchovávanie živočíšnych spermií pri nízkych teplotách. Teoretické dáta experimentálnej časti projektu sú transformované do detailných a komplexných záverov, publikovaných v kvalitných vedeckých časopisoch ako aj úspešne prezentovaných na národných i medzinárodných vedeckých sympóziách. Súčasne slúžia ako plnohodnotný základ pre ďalšie štúdie v oblastiach reprodukčnej biológie, veterinárnych vied a molekulárnej biológie.

V rámci praktických výstupov sa vďaka projektu podarilo vybudovať komplexné laboratórium pre andrológiu, ktoré oplýva najmodernejšími technikami výskumu samčej reprodukcie, a ktoré je vysoko kompatibilné so stratégiami univerzitného Výskumného centra AgroBioTech.

Praktické výstupy vo forme modernizovaných protokolov a overených techník sú aplikovateľné pre chovateľskú prax, výstupy projektu sú významným benefitom aj pre skvalitnenie procesu odberu, analýzy a skladovania živočíšnych ejakulátov na spolupracujúcich inštitúciách ako aj u odberateľských partnerov.

Dôležitou misiou projektu, ktorá bola splnená, bolo zvýšenie pozornosti voči vede a inováciám, ako aj posilnenie konkurencieschopnosti žiadateľskej inštitúcie pri koncepcii a realizácii medzinárodných vedecko-výskumných projektov. Značná časť projektovej aktivity rozšírila aj oblasť znalostí a skúseností študentov Slovenskej poľnohospodárskej univerzity i alumnistov národných či medzinárodných výmenných programov.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Projekt APVV-15-0544 bol koncipovaný s cieľom využitia princípov molekulárnej biológie a agrobiotechnológií pri modernizácii stratégií a programov pre odber, spracovanie a uchovávanie živočíšnych ejakulátov ako aj pre efektívnejšiu prezerváciu samčej fertilizačnej schopnosti v chovateľskej praxi. V rámci riešenia projektu boli optimalizované a štandardizované nové laboratórne postupy detekcie a evaluácie moderných molekulových markerov kvality živočíšnych ejakulátov, súvisiacich so štrukturálnou integritou, funkčnou aktivitou, mitochondriálnym metabolizmom, oxidatívnym statusom ako aj odpoveďou spermie na stresové podmienky s cieľom ich aplikácie a reprodukovateľnosti v praktických podmienkach. Riešitelia taktiež vyvinuli efektívnejšie protokoly pre odber a manipuláciu s ejakulátmi vtákov a zvolených druhov plazov. Súčasne bola zrealizovaná hĺbková analýza mikrobiálnych profilov živočíšnych ejakulátov a vyvinuté odporúčania pre redukciu rizika bakteriálnej kontaminácie biologického materiálu. Benefity realizácie projektu súvisia aj so systematickou a hĺbkovou analýzou vybraných energetických zlúčenín, antioxidačných molekúl, rastlinných extraktov, antimikrobiálnych prírodných látok ako aj ich dopad na samčie reprodukčný systém, kombinujúc tradičné výskumné metódy s molekulárnym, genomickým a proteomickým prístupom, vedúc k novým a komplexným poznatkom o tom, za akých podmienok zvolené biomolekuly pôsobia efektívne. V neposlednom rade sa riešitelia venovali vývinu alternatívnych semenných extenderov slúžiacich pre krátkodobé a dlhodobé uchovávanie živočíšnych spermií, ktoré by mohli byť využiteľné v laboratórnej i chovateľskej

praxi zameranej na zabezpečenie vysokokvalitnej reprodukcie i zachovanie genofondu a biodiverzity živočíšnych zdrojov.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The APVV-15-0544 project was conceived with the aim of applying the principles of molecular biology and agrobiotechnology into the modernization of strategies and programs for the collection, processing and storage of animal ejaculates as well as for a more effective preservation of male fertilization ability in breeding practice. Within the project execution, new laboratory procedures for the detection and evaluation of modern molecular markers of animal ejaculate quality related to structural integrity, functional activity, mitochondrial metabolism, oxidative status as well as sperm response to stress conditions were optimized and standardized for their application and reproducibility in practical conditions. Project members have also developed more efficient protocols for the collection and handling of ejaculates collected from birds and selected reptile species. At the same time, an in-depth analysis of the microbial profiles of animal ejaculates was performed and recommendations were developed to reduce the risk of bacterial contamination of biological material. The benefits of the project are also related to a systematic and in-depth analysis of selected energy compounds, antioxidant molecules, plant extracts, antimicrobial natural substances as well as their impact on the male reproductive system, combining traditional research methods with a molecular, genomic and proteomic approach, leading to new and comprehensive understanding about the conditions under which the selected biomolecules work effectively. Last but not least, members of the research team focused on the development of alternative semen extenders for short-term and long-term storage of animal spermatozoa, which could be used in laboratory and breeding practice aimed to ensure a high-quality reproduction as well as preservation of the gene pool and biodiversity of animal resources.