



## Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

**APVV-18-0146**

**Charakterizácia a kryouchovávanie nepreskúmaných hematopoietických kmeňových/progenitorových buniek slovenských plemien kráľíka**

Zodpovedný riešiteľ **Ing. Jaromír Vašíček, PhD.**

Príjemca

**Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum - Výskumný ústav živočíšnej výroby Nitra**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Výskumný ústav živočíšnej výroby Nitra  
Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Na riešení projektu nespupracovalo zahraničné pracovisko.

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

Patenty a úžitkové vzory sú v štádiu prípravy, vzhľadom na stále prebiehajúcu optimalizáciu izolácie (separácie) králičích hematopoietických kmeňových buniek z kostnej drene pomocou novovytvorených a validovaných CD34 monoklonálnych protilátok.

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

ADC

Vašíček J., Baláži A., Bauer M., Svoradová A., Tirpáková M., Ondruška L., Parkányi V., Makarevich, A.V., Chrenek P. Enrichment of Rabbit Primitive Hematopoietic Cells via MACS Depletion of CD45+ Bone Marrow Cells. *Magnetochemistry* 2021, 7, 11.

<https://doi.org/10.3390/magnetochemistry7010011>

Vašíček J., Baláži A., Bauer M., Chrenek P. SSEA-4 Antigen Is Expressed on Rabbit Lymphocyte Subsets. *Magnetochemistry* 2021, 7, 94.

<https://doi.org/10.3390/magnetochemistry7070094>

Vašíček J., Baláži A., Tirpáková M., Svoradová A., Ondruška L., Parkányi V., Chrenek P. Secretome Analysis of Rabbit and Human Mesenchymal Stem and Endothelial Progenitor Cells: A Comparative Study. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22(22), 12283. <https://doi.org/10.3390/ijms222212283>

Duranova H., Valkova V., Olexikova L., Radochova B., Balazi A., Chrenek P., Vasicek J.: Rabbit Endothelial Progenitor Cells Derived From Peripheral Blood and Bone Marrow: An Ultrastructural Comparative Study. *Microscopy and Microanalysis*, vo. 28, 2022, 756–766.

<https://doi.org/10.1017/S143192762200037X>

ADM

Vašíček J., Baláži A., Bauer M., Svoradová A., Tirpáková M., Tomka M., Chrenek P. (2021). Molecular Profiling and Gene Banking of Rabbit EPCs Derived from Two Biological Sources.

Genes 2021, 12(3), 366. <https://doi.org/10.3390/genes12030366> [IF2020: 4.096]  
 Tirpáková M., Vašíček J., Svoradová A., Baláži A., Tomka M., Bauer M., Makarevich A., Chrenek P. (2021). Phenotypical Characterization and Neurogenic Differentiation of Rabbit Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. Genes 2021, 12(3), 431. <https://doi.org/10.3390/genes12030431> [IF2020: 4.096]

**AFG**  
 Tomková M., Svoradová A., Vašíček J., Makarevič A., Kubovicova E., Chrenek, P. Rabbit adipose-derived stem cell viability assessment using fluorescent microscopy. Sborník Abstrakt "8. mezinárodní conference Stem Cells and Cell Therapy: From research to modern clinical application", Lednice, Česká Republika, 10. – 11. října 2019, 28, ISBN 978-80-7392-328-0.

Vašíček J., Baláži A., Svoradová A., Tomková M., Baldovská S., Ondruška L., Parkányi V., Chrenek, P. Expression of selected cytokines by rabbit endothelial progenitor cells and HUVECs: A preliminary study. Sborník Abstrakt "8. mezinárodní conference Stem Cells and Cell Therapy: From research to modern clinical application", Lednice, Česká Republika, 10. – 11. října 2019, 34, ISBN 978-80-7392-328-0.

Vasicek J., Balazi A., Bauer M., Tirpakova M., Svoradova A., Chrenek P.: Stem cell banking of endangered Slovak farm animal breeds. Animal Physiology 2021 - Book of Abstracts, Češkovice, 22. – 24. September 2021, 46, ISBN 978-80-7509-808-5.

Vašíček J., Baláži A., Bauer M., Svoradová A., Tirpáková M., Chrenek P.: Preliminary validation of monoclonal antibodies generated against two rabbit CD34 synthetic peptides. Book of abstracts of the 11th International Conference Analytical Cytometry, Ostrava, 2. – 5. Oktober 2021, 134, ISBN 978-80-88214-26-7.

**AFH**  
 Supuka P., Chrenek P., Baláži A., Vašíček J., Krešáková L.: The process of breeding the national breed of rabbit - Slovak pastel rex. Proceedings of the Winter School ANIMAL BIOTECHNOLOGY 2020, 6 February, 2020, Nitra, ISBN: 978-80-552-2145-8, 50.

Vašíček J., Baláži A., Bauer M., Svoradová A., Tomková M., Chrenek P.: In vitro expansion of rabbit hematopoietic stem/progenitor cells. Proceedings of the Winter School ANIMAL BIOTECHNOLOGY 2020, 6 February, 2020, Nitra, ISBN: 978-80-552-2145-8, 57.

Vašíček J., Svoradová A., Vozaf J., Baláži A., Bauer M., Chrenek P.: CFU assay of rabbit bone marrow CD45 depleted cells. FOODBIOTECH 2022 – Book of Abstracts, Nitra, October 2022, ISBN 978-80-552-2517-3, 76.

**BFA**  
 Vašíček J., Baláži A., Svoradová A., Tomková M., Chrenek P.: Comparison of ALDH expression in HUVECS and rabbit endothelial progenitor cells using flow cytometry. 10th International Conference Analytical Cytometry, Seč – Ústupy, September 2019, <https://conference.csac.cz/AngiologyKlon-ConferenceCSAC/media/system/2019/abstracts/Posters/P26-Vasicek.pdf>

Vašíček J., Baláži A., Svoradová A., Bauer M., Dujíčková L., Tvrdá E., Vozaf J., Chrenek P.: Validating of novel anti-rabbit CD34 antibodies specificity using Western blot analysis. Animal Physiology 2023 - Book of Abstracts, Lanckorona, 29. – 31. May 2023, 73.

Vašíček J., Baláži A., Svoradová A., Bauer M., Vozaf J., Kuželová L., Chrenek P.: MACS enrichment of CD34 positive cells from rabbit bone marrow – preliminary study. Stem Cells and Cell Therapy 2023 - Book of Abstracts, Mikulov, 8. – 9. June 2023.

**BFB**  
 Vašíček J., Baláži A., Svoradová A., Chrenek P.: Proliferation and differentiation of human and rabbit bone marrow progenitors using hematopoietic CFU assay. Animal Physiology 2022 - Book of Abstracts, Košice, June 2022, ISBN 978–80–974246–0–2, 101.

**GII**  
 Vašíček J., Baláži A., Bauer M., Tirpáková M., Svoradová A., Chrenek P.: Induced neurogenesis in rabbit mesenchymal stem and endothelial progenitor cells. Abstract book "2nd Conference of the Visegrád Group Society for Developmental Biology", Szeged, Maďarsko, 2. – 5. September 2021, 23.

### Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky projektu prinášajú nové poznatky o králičích hematopoietických kmeňových/progenitorových (CD34 pozitívnych) bunkách. Vďaka riešenému projektu bol definovaný približný fenotyp, proliferačná schopnosť a diferenciačná kapacita

hematopoietických zárodočných buniek kráľika, získaných buď nepriamym obohatením (odstránením zreých CD45+ hematopoietických buniek), alebo priamou izoláciou CD34+ buniek. Optimalizovaná metodika izolácie týchto buniek umožňuje ich následné kryouchovávanie v podobe významných genetických zdrojov z domácich plemien králikov (Holíčsky modrý králik a Slovenský sivomodrý rex). Okrem toho je možné validované CD34 protilátky využiť pre identifikáciu hematopoietických kmeňových buniek ako aj pre ďalší biomedicínsky výskum v oblasti hematopoietických ochorení pri využití kráľika ako biologického modelu.

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

Hlavným cieľom projektu bolo priniesť úplne nové poznatky ohľadom králičích zárodočných hematopoietických buniek. Hoci bolo riešenie výskumných úloh projektu významne ovplyvnené pandemiou Covid-19, väčšina čiastkových cieľov projektu bola úspešne splnená. Splnenie ostatných čiastkových cieľov sa predpokladá v najbližšej dobe, pričom získané výsledky budú zhrnuté v nasledujúcich monitorovacích správach po ukončení projektu. V prvom rade bola úspešne optimalizovaná metodika imunomagnetickkej deplecie CD45+ buniek z kostnej drene králikov s účinnosťou až 95%. Získané bunky vykazovali po 2-dňovej proliferácii okrúhly tvar a výrazne zvýšenú expresiu CD34 (marker hematopoietických kmeňových/progenitorových buniek). Zároveň bunky len veľmi nízko exprimovali CD45, čo potvrdzuje ich zárodočný stav. Okrem toho tieto bunky vykazovali expresiu ďalších membránových markerov a transkripčných faktorov typických pre kmeňové bunky (CD44, CD49f, CD117, ALDH, GATA1, GATA2, NANOG, OCT4, SOX2 a SOX17). Diferenciačná schopnosť týchto buniek bola overená vznikom špecifických hematopoietických bunkových línii (BFU-E, CFU-E, CFU-GM a CFU-GEMM). V druhom rade boli validované (overené) viaceré novovytvorené protilátky pre imunodetekciu králičieho CD34 proteínu pomocou prietokovej cytometrie a Western blot analýzy. Validované CD34 protilátky (dva subklony vytvorené voči syntetickému králičiemu CD34 peptidu a dva subklony vytvorené voči rekombinantnému králičiemu CD34 proteínu) boli použité pre imunomagnetické obohatenie CD34+ buniek z kostnej drene kráľika s účinnosťou separácie od 50 do 80% v závislosti od použitého separačného programu. Avšak prežítateľnosť týchto buniek výrazne klesla na 50%, prípadne až 23% v závislosti od použitého separačného programu. Zvýšený výskyt mŕtvych buniek v separovaných frakciách najskôr súvisí s nešpecifickou väzbou primárnych protilátok a/alebo magnetických nanopartikul na mŕtve bunky, čo v konečnom dôsledku spôsobí ich obohatenie v už aj tak zriedkavej populácii CD34+ buniek. Vzhľadom k tomuto javu, sa metodika magnetickej izolácie králičích CD34+ buniek stále optimalizuje, za účelom zvýšenia životaschopnosti vyseparovaných buniek pre ich ďalšie použitie (proliferácia a diferenciácia). Napriek zníženej životaschopnosti magnetickej separovaných CD34+ buniek, preukázala fenotypová analýza týchto buniek výrazne zvýšenú expresiu CD34. Okrem toho tieto bunky vo zvýšenej miere exprimovali CD45, CD38, CD44, CD49f, CD90, CD172a a CD117 (markery hematopoietických progenitorových, ale aj kmeňových buniek). Okrem magnetickej separácie bola overená možnosť cytometrickej separácie CD34+ buniek z kostnej drene kráľika pomocou novovytvorenej CD34 protilátky. V závislosti od počtu opakovaných separácií sa dosiahla účinnosť separácie od 50 do 80% (dve, resp. tri opakované separácie) s viac ako 90% životaschopnosťou CD34+ buniek. Tieto bunky navyše vykazovali vysoký proliferačný potenciál po niekoľko dňovej kultivácii. Optimalizácia tejto metodiky izolácie králičích CD34+ buniek pokračuje aj po ukončení projektu. V rámci projektu boli na našom pracovisku ustajnené králiky plemien (Holíčsky modrý králik a Slovenský sivomodrý rex), ktoré budú hneď po záverečnej optimalizácii metodiky izolácie králičích hematopoietických kmeňových/progenitorových buniek využité pre získanie a uskladnenie kmeňových buniek v génovej banke živočíšnych genetických zdrojov.

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

The main objective of the project was to bring completely new knowledge about rabbit primitive hematopoietic cells. Although the implementation of the research tasks of the project was significantly affected by the Covid-19 pandemic, most of the sub-goals of the project were successfully achieved. The other sub-goals are expected to be achieved in the

near future and the obtained results will be summarised in subsequent monitoring reports after the end of the project. At first, the methodology of immunomagnetic depletion of CD45+ cells from rabbit bone marrow was successfully optimised with an efficiency up to 95%. The obtained cells showed a round shape and markedly increased expression of CD34 (marker of hematopoietic stem cells/progenitor cells) after 2 days of proliferation. At the same time, the cells expressed CD45 at very low level, confirming their primitive status. In addition, these cells showed expression of other membrane markers and transcription factors typical for stem cells (CD44, CD49f, CD117, ALDH, GATA1, GATA2, NANOG, OCT4, SOX2 and SOX17). The differentiation capability of these cells has been verified by the development of specific hematopoietic cell lines (BFU-E, CFU-E, CFU-GM and CFU-GEMM). Secondly, several newly developed antibodies for the immunodetection of rabbit CD34 protein have been validated using flow cytometry and Western blot analysis. Validated CD34 antibodies (two subclones produced against synthetic rabbit CD34 peptide and two subclones produced against recombinant rabbit CD34 protein) were used for the immunomagnetic enrichment of CD34+ cells from rabbit bone marrow with a 50-80% separation efficiency depending on the separation programme used. However, the viability of these cells has decreased significantly to 50% or up to 23% depending on the separation programme used. The increased incidence of dead cells in separated fractions is most probably caused by the non-specific binding of primary antibodies and/or magnetic nanoparticles to dead cells, ultimately resulting in their enrichment in an already rare population of CD34+ cells. Due to this phenomenon, the methodology of magnetic isolation of rabbit CD34+ cells is still being optimised in order to increase the viability of the separated cells for their further use (proliferation and differentiation). Despite reduced viability of magnetically separated CD34+ cells, phenotypic analysis of these cells has shown significantly increased expression of CD34. In addition, CD45, CD38, CD44, CD49f, CD90, CD172a and CD117 (markers of haematopoietic progenitors, but also of stem cells) were expressed in higher levels in these cells. In addition to magnetic separation, the possibility of cytometric separation of CD34+ cells from rabbit bone marrow by a newly generated CD34 antibody has been verified. Depending on the number of repeated separations, the separation efficiency was achieved from 50 to 80% (two or three repeated separations, respectively) with a viability of more than 90% in CD34+ cells. In addition, these cells showed a high proliferative potential after several days of cultivation. The optimisation of this methodology for the isolation of rabbit CD34+ cells continues after the end of the project. As part of the project, rabbits of domestic breeds (Holic blue rabbit and Slovak grey-blue rex) were housed at our institute, which will be used immediately after the final optimisation of the methodology for isolation of rabbit hematopoietic stem cells/progenitor cells to obtain and store stem cells in the gene bank of animal genetic resources.