



## Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

**APVV-19-0111**

**Kryouchovávanie gamet a embryí hovädzieho dobytku pre účely génovej banky**

Zodpovedný riešiteľ **Ing. Alexander Makarevič, DrSc.**

Príjemca

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

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum (NPPC) - Výskumný ústav živočíšnej výroby Nitra (VÚŽV Nitra);  
Centrum biovied SAV, v.v.i. Bratislava - Ústav biochémie a genetiky živočíchov

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

Katedra Zoológie, Univerzita Palackého v Olomouci (UPOL), Olomouc, ČR  
Biotechnologický ústav Akadémie vied Českej republiky, v.v.i., BIOCEV, Vestec, ČR  
Fakulta Agrobiológie, Potravinových a Prírodných Zdrojov, Česká zemědělská univerzita v Praze (ČZU), Praha, ČR  
Ústav Fyziológie a Genetiky Živočíchov ČAV, Libeň, ČR

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

Neboli

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

1. Jankovičová Jana - Sečová, Petra - Michalková, Katarína - Antalíková, Jana. Tetraspanins, More than Markers of Extracellular Vesicles in Reproduction. In International Journal of Molecular Sciences, 2020, vol. 21, no. 20, art. no. 7568.
2. Jankovičová, Jana- Sečová, Petra - Horovská, Ľubica - Olexiková, Lucia - Dujíčková, Linda - Makarevich, A.V. - Michalková, Katarína - Antalíková, Jana. Distribution of tetraspanins in bovine ovarian tissue and fresh/vitrified oocytes. In Histochemistry and Cell Biology, 2023, vol. 159, no. 2, p. 163-183.
3. Olexiková L., Dujíčková L., Makarevich A.V., Bezdíček J., Sekaninová J., Nesvadbová A., Chrenek P. Glutathione during post-thaw recovery culture can mitigate deleterious impact of vitrification on bovine oocytes. In Antioxidants, 2023, 12, 35. <https://doi.org/10.3390/antiox12010035>.
4. Dujíčková L., Olexiková L., Makarevich A.V., Bartková A., Němcová L., Strejček F., Chrenek P. Astaxanthin added during post-warm recovery mitigated oxidative stress in bovine vitrified oocytes and improved quality of resulted blastocysts. In Antioxidants, 13, 2024, 556. <https://doi.org/10.3390/antiox13050556>.

### Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky riešenia projektu môžu byť uplatnené pri realizácii programov ochrany biodiverzity živočíchov, pri tvorbe génovej banky živočíšnych genetických zdrojov, v laboratóriách zaoberajúcich sa tvorbou embryí in vitro z kryokonzervovaných vajíčok (gamét) živočíchov. Okrem toho, poznatky z projektu môžu byť využité pri výuke študentov univerzít poľnohospodárskeho a biologického smeru.

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

Výsledkom realizácie projektu je rozpracovaná metodika kryokonzervácie oocytov hovädzieho dobytku, ktorá zabezpečila stabilné parametre kvality oocytov po rozmrazení. Bola použitá technika vitrifikácie – priamym ponorením do tekutého dusíka na vitrifikačnom nosiči pozostávajúcom z elektron-mikroskopickej sieťky upevnenej na držiaku. Avšak vývojový potenciál embryí, získaných z takýchto oocytov je ešte stále nižší v porovnaní s embryami získanými z čerstvých oocytov. Preto sme v danom projekte zvolili za úlohu otestovať dve rôzne látky s antioxidačným účinkom na zvyšovanie viability a vývojového potenciálu vitrifikovaných oocytov (glutatión a astaxantín) a na zlepšenie kryotolerancie blastocýst získaných z vitrifikovaných oocytov (astaxantín). V procese realizácie projektu sa nám podarilo použitím antioxidantov počas krátkej doby (3 hod) regenerácie oocytov po rozmrazení, neutralizovať negatívny vplyv vitrifikácie (v dôsledku kryopoškodení) a zlepšiť parametre viability oocytov na úroveň čerstvej kontroly. Okrem toho, po vitrifikácii a rozmrazení blastocýst získaných z vitrifikovaných oocytov sme použitím antioxidantu astaxantínu získali embryá odolné voči zmrazovaniu a svojou kvalitou porovnateľné s blastocystami pochádzajúcimi z čerstvých oocytov.

Detailnou analýzou distribúcie viacerých tetraspanínov (CD9, CD81, CD151, CD82 a CD63) na ovariálnych tkanivách kráv, na in vitro maturovaných ocytoch, získaných z čerstvých ovárií ako aj na vitrifikovaných oocytoch, sme vytvorili základ pre porovnávaciu analýzu s kryokonzervovanými oocyty a z nich produkovanými embryami. Ďalšia detekcia vybraných tetraspanínov (CD9, CD81, CD63), využívaných aj na identifikáciu a charakterizáciu extracelulárnych vezikúl (EV), ich reakčný vzor, zaznamenaný na 4-8 bunkových embryách naznačujú, že tetraspaníny môžu byť súčasťou EV produkovaných embryom. EV sú považované za dôležité mediátory komunikácie medzi embryom a matkou počas preimplantačného vývoja embryí cicavcov, preto dáta získané počas riešenia projektu budú podkladom pre ďalšie detailné štúdie s cieľom prispieť k pochopeniu vplyvu kryokonzervácie na kvalitu a vývojový potenciál embryí.

Dosiahnuté výsledky svedčia o schopnosti riešiteľského kolektívu získavať in vitro embryá, vhodné pre dlhodobé skladovanie v génovej banke, ktoré po rozmrazení budú mať lepšiu prežiteľnosť a vývojovú schopnosť, čo zodpovedá stanoveným cieľom daného projektu.

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

The result of the implementation of the project is an elaborated methodology for cryopreservation of bovine oocytes, which ensured stable quality parameters of oocytes after thawing. This vitrification technique consisted in direct immersion into liquid nitrogen of a vitrification carrier composed of an electron-microscopic mesh grids fixed on a holder. However, the developmental potential of embryos obtained from such oocytes is still lower compared to embryos obtained from fresh oocytes. Therefore, in this project, we chose to test two different substances with an antioxidant effect for increasing the viability and developmental potential of vitrified oocytes (both glutathione and astaxanthin) and for improving the cryotolerance of blastocysts obtained from vitrified oocytes (astaxanthin). In the process of implementing the project, we succeeded to neutralize the negative impact of vitrification (due to cryodamage) and improve oocyte viability parameters to the level of a fresh control by using antioxidants during a short period (3 hours) of regeneration of oocytes after thawing. In addition, after vitrification and warming of blastocysts obtained from vitrified oocytes, using the antioxidant astaxanthin, we obtained embryos resistant to freezing procedure and comparable in quality to blastocysts derived from fresh oocytes.

Detailed analysis of the distribution of several tetraspanins (CD9, CD81, CD151, CD82 and CD63) on bovine ovarian tissues, in vitro matured oocytes obtained from fresh ovaries, as well as on vitrified oocytes, provided a basis for comparative analysis with cryopreserved oocytes and embryos produced from them. Further detection of selected tetraspanins (CD9,

CD81, CD63), commonly used to identify and characterize extracellular vesicles (EVs), and their reaction pattern recorded on 4-8 cell embryos may suggest that tetraspanins may be part of embryo-produced EVs. EVs are considered to be important mediators of embryo-maternal communication during the preimplantation development of mammalian embryos. Therefore, the data obtained during the project, will provide the basis for further detailed studies to contribute to the understanding of the impact of cryopreservation on embryo quality and developmental potential.

The achieved results evidence to the ability of the research team to obtain in vitro embryos, suitable for long-term storage in the gene bank, which after thawing will have sufficient survivability and development ability, which corresponds to the stated goals of the given project.