

**Formulár ZK - Záverečná karta projektu**

Riešiteľ: Doc. Peter Chrenek, DrSc.	Evidenčné číslo projektu: LPP-0126-06
Názov projektu: Vplyv integrácie hFVIII, EGFP génov a vitrifikácie na kvalitu králičích embryí	

Na ktorých pracoviskách bol projekt riešený:	CVŽV Nitra (bývalé SCPV Nitra)
Ktoré zahraničné pracoviská spolupracovali pri riešení (názov, štát):	

Udelené patenty alebo podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory vychádzajúce z výsledkov projektu:	
Publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu (uveďte i publikácie prijaté do tlače):  <i>Uvádzajte maximálne päť najvýznamnejších publikácií.</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Makarevich A.V., <b>Chrenek P.</b>, Olexikova L., Popelkova M., Turanova Z., Ostro A., Pivko J.: Post-thaw survival, cell death and actin cytoskeleton in gene-microinjected rabbit embryos after vitrification. <i>Theriogenology</i>, 70, 2008, 675-681.</li> <li>2. Roychoudhury S., Curlej J., Bulla J., <b>Chrenek P.</b>: Hypodiploidy as a prominent attributor to chromosomal aneuploidy in transgenic rabbit embryos. <i>Cz. J. Anim. Sci.</i>, 53, 2008, 388-397.</li> <li>3. Krylov V., Tlapakova T., Macha J., Curlej J., Ryban L., <b>Chrenek P.</b>: Localization of human coagulation factor VIII (hFVIII) in transgenic rabbit by FISH-TSA: identification of transgene copy number and transmission to the next generation. <i>Folia Biologica (Praha)</i>, 54, 2008, 121-124.</li> <li>4. Popelková M., Turanová Z., Koprđová L., Ostró, A., Toporcerová S., Makarevich A.V., <b>Chrenek P.</b> Effect of vitrification technique and assisted hatching on rabbit embryo developmental rate. <i>Zygote</i>, 17(1), 2009, 57-61..</li> <li>5. Curlej J., Bulla J., <b>Chrenek P.</b>: Occurrence of chromosomal aneuploidy in rabbit oocytes and embryos at different developmental stages. <i>Zygote</i>, <b>accepted September 2009</b></li> </ol>
V čom vidíte uplatnenie výsledkov projektu:	Získané výsledky poukázali na možnosti uchovávanía geneticky modifikovaných králičích embryí (výsledky hodnotenia kvality po rozmrazení) pre cieľnú produkciu transgénnych králikov a prípadne pre účely izolácie embryonálnych kmeňových buniek. Získané výsledky poukázali na možnosti uchovávanía geneticky modifikovaných

## Charakteristika výsledkov

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

Prežiteľnosť králičích embryí po mikroinjekcii, integrácii transgénu a vitrifikácii sme hodnotili sledovaním preimplantačného vývoja do dosiahnutia štádia voľnej blastocysty („hatching“), zisťovali sme celkový počet buniek v embryu, počet buniek v ICM oblasti, percentuálne zastúpenie apoptotických buniek a merali diameter embryí. Signifikantný rozdiel ( $p < 0,05$ ) v celkovom počte buniek sme zistili medzi kontrolnou a EGFP skupinou embryí. Najvyšší podiel apoptotických buniek sme zaznamenali u EGFP embryí (6%). V prípade zisťovania vplyvu vitrifikácie na vývojovú potenciú králičích embryí sme v druhom experimente zistili štatisticky vysoko preukazný rozdiel ( $p < 0,01$ ) pri porovnaní embryí kontrolných s vitrifikovanými transgénymi (EGFP - 68% vs. hFVIII - 69%). Štatisticky vysoko významný rozdiel ( $p < 0,01$ ) sme zistili v prípade apoptotických buniek (EGFP vs. kontrola, EGFP vs. hFVIII, kontrola vs. hFVIII), pričom najvyššie percento (2,90%) sa potvrdilo u EGFP skupiny vitrifikovaných embryí. Zvýšený podiel (7,96%) tukových kvapôčok a najviac porušených mikrokľvov (1,62%) sme zistili u EGFP skupiny. Cytoplazmatická, jadrová membrána aj medzibunkové kontakty boli najviac poškodené u mikroinjektovanej skupiny (1,30% resp. 0,82% resp. 0,56%). Transgénne embryá vykazovali najvyšší podiel patologických zmien v prípade mitochondrií (4,12%), drsného endoplazmatického retikula (2,37%) a Golgiho aparátu (1,32%). Transgénne králiky vykazujú vyššiu frekvenciu výskytu aneuploidných sád chromozómov v porovnaní s kontrolnou skupinou.

Na základe našich výsledkov možno skonštatovať, že znížená prežiteľnosť transgénnych vitrifikovaných embryí do štádia blastocysty, má za následok skôr proces vitrifikácie, než vlastná mikroinjekcia, či integrácia a expresia transgénu v bunkách. Patologické zmeny v ich ultraštruktúre možno pripísať kombinácii mikroinjekcie a vitrifikácie.

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

About 100% of embryos either in the control or experimental (EGFP and hFVIII) groups reached the hatching blastocyst stage. Significant differences ( $p < 0.05$ ) in total cell number were recorded between the control and EGFP-positive embryos. The highest apoptotic cell occurrence (6%) was found in the EGFP-positive embryos produced by the microinjection. Statistically significant differences ( $p < 0,01$ ) in detection of embryo developmental potency after vitrification were found between the control embryos and both the EGFP (68%) and the hFVIII-positive embryos (69%), respectively. Developmental arrest was observed in 20% of the EGFP embryos and in 25% of the hFVIII embryos. The highest proportion of apoptotic cells (2,90%) was detected in the EGFP-positive embryos. A higher proportion of lipid droplets (7,96%) and destructed trophoblastic microvilli (1,62%) was found in the EGFP embryos. Damages in cytoplasmic (1,30%), nuclear (0,82%) membranes and in junctional contacts (0,56%) were found in the microinjected embryos. Pathological changes in mitochondria (4,12%), rough endoplasmic reticulum (2,37%) and Golgi apparatus (1,32%) were detected at highest level in the EGFP embryo. Generally, transgenic rabbits exhibited higher aneuploidy occurrence compared to non-transgenic ones.

In conclusion, decreased survival of transgenic embryos is primarily caused by consequences of the vitrification process. Pathological changes on embryo ultrastructural level are caused by vitrification and microinjection processes.

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

Podpis zodp. riešiteľa: .....

Dátum: .....

Podpis štatutárneho zástupcu: .....

Pečiatka: