

## VETERINARSKA FAKULTETA

### Tamara Dolenšek in Tanja Knific

Raziskovalno nalogo "Ločevanje apoptotičnih merjaščevih semenčic z uporabo magnetnih mikrokroglic z vezanim aneksinom V", nagrajeno z Univerzitetno Prešernovo nagrado, sta izvedli študentki 5. letnika Veterinarske fakultete, **Tamara Dolenšek in Tanja Knific**.

**Mentorica naloge je doc. dr. Petra Zrimšek in somentor doc. dr. Janko Mrkun.**

### Predstavitev nagrajenk

**Tamara Dolenšek** se je rodila 26. aprila 1989 v Ljubljani. Gimnazijo je zaključila na Zavodu Sv. Frančiška Saleškega v Želimljah kot zlata maturantka.

**Tanja Knific** se je rodila 9. julija 1988 v Kranju, kjer je Ekonomsko gimnazijo zaključila z odličnim uspehom. Študentki sta se leta 2007 vpisali na Veterinarsko fakulteto Univerze v Ljubljani. V času študija sta obe redno napredovali in prejeli priznanje za najboljši uspeh v letniku;

amara Dolenšek v tretjem letniku in Tanja Knific v drugem letniku.

Raziskovalna naloga obravnava programirano celično smrt (apoptoza), ki prispeva k neuspehom v postopkih asistiranje reprodukcije kot tudi k padcu kakovosti zamrznjenega semena. Ena od značilnosti apoptoze, ki jo lahko uporabljamo v procesu odstranitve apoptotičnih celic iz semena, je eksternalizacija fosfatidilserina. Na področju humane reprodukcije so za odstranitev apoptotičnih semenčic iz semena že uspešno uporabili metodo ločevanja celic z uporabo polimernih magnetnih mikrokroglic (MACS), konjugiranih z aneksinom V, ki se veže na fosfatidilserin. Omenjeno metodo za ločevanje merjaščevih semenčic so prvič uporabili v predstavljeni raziskavi, poleg te pa še metodo z uporabo magnetnih mikrokroglic, ki prepoznajo antigen v plazemski membrani apoptotičnih in mrtvih semenčic.

Z uporabo različnih metod, kot je računalniško podprta analiza semena, pretočna citometrija in klasične metode za vrednotenje kakovosti semena so ugotovili, da se subpopulacije ločenih semenčic med seboj razlikujejo v deležu apoptotičnih in živih semenčic. Metoda MACS za ločevanje apoptotičnih in mrtvih celic pa je povzročila znižano gibljivost in preživitveno sposobnost semenčic kot tudi povečala delež morfoloških napak na semenčicah. Rezultati kažejo na to, da metoda MACS ni primerna za ločevanje merjaščevih semenčic pri pogojih, ki so jih uporabili v raziskavi, kljub temu, da so metodo že uspešno uporabili pri ločbi humanih apoptotičnih semenčic.

### Obrazložitev

Programirana celična smrt (apoptoza) prispeva k neuspehom v postopkih asistiranje reprodukcije kot tudi k padcu kakovosti zamrznjenega semena. Ena od značilnosti apoptoze, ki jo lahko uporabljamo v procesu odstranitve apoptotičnih celic iz semena, je eksternalizacija fosfatidilserina (PS). Na področju humane reprodukcije so za odstranitev apoptotičnih semenčic iz semena že uspešno uporabili metodo ločevanja celic z uporabo polimernih magnetnih mikrokroglic (MACS), konjugiranih z aneksinom V, ki se veže na PS. Omenjeno metodo za ločevanje merjaščevih semenčic smo prvič uporabili v predstavljeni raziskavi, poleg te pa še metodo z uporabo magnetnih mikrokroglic, ki prepoznajo antigen v

plazemski membrani apoptotičnih in mrtvih semenčic. Z metodo MACS smo pri ločbi 12 vzorcev merjaščevega semena po tridnevnem hranjenju pri 16 - 17 °C pridobili dve frakciji semena in sicer nevezano (neapoptotične/žive semenčice) in vezano (apoptotične/mrtve semenčice). Z metodo pretočne citometrije smo natančno, objektivno in v kratkem času analizirali integriteto plazemske membrane semenčic. Uporabili smo barvanje semenčic z aneksinom V, konjugiranim z Alexa Fluor 488 (A), in propidijevim jodidom (PI), ki nam je omogočilo ločbo semenčic v štiri subpopulacije: žive (A-/PI-), zgodnje apoptotične; žive (A+/PI-), pozno apoptotične in zgodnje nekrotične; mrtve (A+/PI+), pozno nekrotične; mrtve (A-/PI+). Vezane frakcije, ki smo jih pridobili z obema omenjenima postopkoma MACS, se med seboj niso razlikovale v nobenem testiranem parametru za ugotavljanje značilnosti semena; enako tudi ne nevezane frakcije. Subpopulacije zgodnje apoptotičnih in pozno nekrotičnih (mrtvih) semenčic smo zasledili v vseh vzorcih, vendar pa so bile omenjene subpopulacije semenčic v večji meri zastopane v vezanih frakcijah kot nevezanih frakcijah in izhodnih vzorcih. Najmanjši delež živih semenčic smo zasledili v vezanih frakcijah; le-ta se je statistično značilno razlikoval od deleža živih semenčic v izhodnih vzorcih.

Gibljivost in progresivna gibljivost, ki smo ju določili z računalniško podprto analizo semena (CASA), sta se v nevezanih frakcijah statistično značilno znižali glede na izhodni vzorec, enako tudi preživitvena sposobnost semenčic, določena po barvanju z barvilom Hoechst.

Omenjenih parametrov v vezanih frakcijah ni bilo mogoče ovrednotiti, ker je bilo število semenčic v teh frakcijah premajhno, da bi z metodo CASA pridobili relevantne rezultate. Metoda MACS je povzročila morfološke napake na semenčicah, ki smo jih ugotavljali z barvanjem semenčic z barvilom Giemsa.

V frakcijah po ločbi semenčic se je pojavila neobičajna anomalija na glavi, delež morfološko normalnih semenčic se je statistično značilno zmanjšal, delež semenčic z odlepljenim akrosomom pa povečal glede na izhodni vzorec.

Z uvedbo komercialnega testa Halomax® smo fragmentacijo DNK ugotavljali v obliki velikega "halo efekta", ki se širi okrog glave semenčice, pri čemer nismo opazili statistično značilnih razlik med skupinami vzorcev, ugotovili pa smo pozitivno korelacijo med stopnjo fragmentacije DNK in pojavom perzistirajoče kapljice na semenčicah v izhodnih vzorcih.

Metoda MACS za ločevanje apoptotičnih in mrtvih celic je povzročila znižano gibljivost in preživitveno sposobnost semenčic kot tudi povečala delež morfoloških napak na semenčicah. Naši rezultati kažejo na to, da metoda MACS ni primerna za ločevanje merjaščevih semenčic pri pogojih, ki smo jih uporabili v raziskavi, kljub temu da so metodo že uspešno uporabili pri ločbi humanih apoptotičnih semenčic.