

Na mestu uvodnika/On the place of leading article

NASTAJANJE JAJČNIH CELIC DE-NOVO TUDI PO ROJSTVU?**Borut Kovačič, Veljko Vlajsavljević*

Oddelek za reproduktivno medicino, Splošna bolnišnica Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

Uvod

Dobra tri leta se v najpomembnejših strokovnih revijah s področja naravoslovja in medicine, kot so *Nature*, *Science*, *Cell*, *Developmental Biology*, *Differentiation*, *Stem Cells* in drugih, pogosto pojavljajo prispevki, v katerih znanstveniki poročajo o izsledkih novih raziskav o delovanju jajčnika pri sesalcih v odraslem obdobju. Skupni namen teh raziskav je ugotoviti, ali lahko jajčne celice nastajajo v jajčnikih odraslih ženskih osebkov tudi po rojstvu.

Pregled raziskav

Raziskovanje je sprožila objava članka Johnsona in sod. leta 2004 (skupine, ki jo vodi Jonathan Tilly) v reviji *Nature*, v katerem trdijo, da so jajčniki mišk tudi po rojstvu sposobni proizvajati jajčne celice de-novo iz morebitnih germinalnih matičnih celic, nahajajočih se na površini jajčnika (Johnson in sod. 2004). Do tedaj je veljalo, da je pri sesalcih število jajčnih celic določeno ob rojstvu in se s staranjem samo še zmanjšuje.

V številnih laboratorijih po svetu so do tedaj veljavno dogmo postavljali na preizkušnjo z različnimi eksperimentalnimi metodami, v glavnem na mišjih modelih, bodisi z metodami štetja foliklov pri različnih starostih in fazah estralnega cikla, bodisi z določanjem specifičnih celičnih markerjev. V strokovni literaturi, predvsem v prej omenjenih revijah so se vrstili številni komentarji, pogosto pomisleki nad takšnimi izsledki in tudi kritike uporabljene metodologije. Ista skupina je naslednjega leta v reviji *Cell* novo ugotovljeno sposobnost jajčnika pripisala aktivnosti bodisi progenitorskih celic ovarijskega epitelijskega, bodisi matičnih celic kostnega mozga, ki preko krvožilnega sistema zaidejo v jajčnik in tam predstavljajo prekurzorje novih jajčnih foliklov (Johnson in sod. 2005).

O nastajanju novih jajčnih celic in foliklov je v istem času precej pisal tudi Antonin Bukovsky s sod. (2004, 2005, 2006) in pritrjeval hipotezi Johnsona. V celicah ovarijskega epitelijskega odraslih žensk je z imunohistokemijsko metodo dokazoval imunoreaktivnost na proteine zone pellucide – ovojnice jajčnih celic in citokeatina – proteina, značilnega za oocite. Oba proteina je zasledil v preprostih okroglih celicah, podobnih jajčnim celicam, ki jih je našel v skorji jajčnika, in ki še

niso bile opisane. Trdil je, da so to progenitorji germinalnih celic, ki so nastali iz matičnih celic jajčnika. Njihove značilnosti bi naj ustrezale novo nastajajočim oocitom.

Naglo so se razširile tudi novice o novih obetih reproduktivne medicine pri zdravljenju neplodnosti, predvsem s ponovno oživitvijo izčrpane vloge jajčnikov, ki sicer nastopi naravno v višji starosti žensk, lahko pa tudi bistveno prej.

Nova spoznanja so dopolnjevali nekateri novi strokovni članki, ki so dodatno podpirali novo teorijo. Kerr in sod. (2006) so z metodo štetja foliklov v mišjih jajčnikih ugotovili stalno število od pubertete do srednje starosti živali, kar je podpiralo Johnsonovo teorijo.

Dodatne razprave je sprožila spontana zanositev domnevno neplodne ženske po kemoterapiji, po tem, ko so ji po kemoterapiji opravili podkožno transplantacijo odmrznjenega ovarijskega tkiva za ponovno vzpostavitev izgubljenega endokrinega delovanja (Oktay in sod. 2005). Sicer so o nosečnostih po kemoterapiji in presaditvi kostnega mozga poročali že leta 1996 (Sanders in sod. 1996).

Vrsta drugih prispevkov pa je novo tezo zavračala. Tako je Byskov s sod. (2005) ponovil poskus in uporabil isto vrsto različno starih mišk kot Johnson, vendar ni mogel dokazati nove sinteze DNA v jajčnikih in aktivnosti regenerativnih mehanizmov, ki bi prispevali k nastajanju novih jajčnih celic. Trdil je, da so se avtorji nove teorije močno zmotili pri metodi štetja in upoštevali tudi atretične folikle, ki iz jajčnika izredno počasi izginjajo. Zanimivo je tudi, da pri opazovanju foliklov v jajčnikih odraslih miši nikoli ni zasledil oocitov pred diplotenom prve mejotske delitve. Torej tudi če bi oociti nastajali de-novo iz somatskih celic, ni dokazov o redukcijski delitvi, ki je sicer pri sesalcih dolgotrajen proces.

Bristol-Gould s sod. (2006) je postavil matematični model, s katerim je dokazal, da število foliklov v mišjem jajčniku počasi upada s starostjo živali ter da nastajanje foliklov de-novo ni potrebno.

Drugi poskus Johnsona in sod., ki je pripisoval vlogo kostnega mozga pri obnovi foliklov, so z istim sevom živali preverjali Eggan in sod. (2006) in se vprašali: Ali lahko gensko markiran kostni mozeg donorjev sproži ovulacijo pri prejemnikih, ki so bili podvrženi kemoterapiji? V poskusu so uporabili GFP transgene miši

* V tej številki objavljamo članek I. Virant-Klun in sod.: Matične celice jajčnika: oogeneza in vitro?, ki odpira zelo zanimivo področje na polju reprodukcije, in zato objavljamo tudi komentar recenzenta.

(katerih vse telesne celice izražajo zeleno fluorescenco) kot donorje kostnega mozga in navadne miši, ki so jim s kemoterapijo ablirali jajčne celice, kot prejemnike. Po stimulaciji ovulacije pri prejemnikih so zasledili ponovno vzpostavljeno endokrino aktivnost in tudi ovulacije, vendar nobena ovulirana jajčna celica ni izhajala od donorjev. S tem poskusom so ovrgli tezo, da bi ovulirane jajčne celice lahko nastale iz matičnih celic kostnega mozga. Hkrati so dokazali tudi, da po kemijsko povzročeni ablaciji jajčnih celic ostane še vedno zadosti neprizadetih oocitov, ki postanejo opazni po stimulaciji ovulacije – kar je razlaga tudi za nosečnosti pri ženskah po kemoterapiji in presaditvi kostnega mozga.

Tillyjeva skupina je ponovno potrdila (Lee in sod. 2007), da celice kostnega mozga prispevajo k nastajanju novih germinalnih celic v ovariju, vendar so predvidevali, da folikli s temi celicami ostanejo v preantralnem stadiju. Komentarji drugih znanstvenikov po teh raziskavah so bili, da če neo-oogeneza obstaja v odraslem jajčniku, potem novo nastale jajčne celice ne morejo doseči ovulatornega stadija.

Veitia in sod. (2007) so preiskali bolnico s ponovno vzpostavljeno plodnostjo in nosečnostjo po kemoterapiji in presaditvi kostnega mozga. Z analizo polimorfničnih satelitov, ki je pokazala genetsko povezavo otroka in matere, ne donorja, so potrdili, da kostni mozeg donorja ni povzročil neo-oogeneze.

Dilemo o tem, ali lahko ženske proizvajajo jajčne celice še po rojstvu, pa je letos ovrgla tudi skupina pod vodstvom Davida Keefeja iz Univerze Južna Florida (Liu in sod. 2007). Ugotavljali so, ali človeški jajčnik vsebuje ovarijske matične celice in ali je prisotna neo-oogeneza. Če je, morajo somatske matične celice, ki vsebujejo diploidno število kromosomov, v katerem koli življenjskem obdobju vstopiti v proces redukcijske delitve ali mejoze. Z najbolj občutljivejšimi molekularnimi metodami (RT-PCR) so analizirali ekspresijo določenih genov, poznanih za mejozo in genov za proliferacijo germinalnih celic, ki so potrebni za neo-oogenezo. Preiskovali so jajčnike odraslih žensk, starih od 28–53 let in jih primerjali s testisi in fetalnimi jajčniki. Dokazali so, da procesi aktivne mejoze, neo-oogeneze in proliferacije germinalnih celic niso prisotni v normalnem odraslem človeškem jajčniku.

O tej temi so letos govorili tudi na kongresu Evropskega združenja za humano reprodukcijo in embriologijo (ESHRE) v Lyonu, ki se ga je udeležilo okoli 5000 udeležencev. Po poročilu o dosedanjih raziskavah neo-oogeneze so predavanje povzeli z ugotovitvijo, da če postnatalna neo-oogeneza obstaja pri miših, potem je ta vrsta verjetno izjema med sesalci, saj pri človeku prav gotovo in z dokazi potrjeno ni prisotna. Raziskave pa se nadaljujejo.

Zanimivo je dejstvo, da pred tremi meseci na kongresu v Lyonu nihče ni niti omenil ali kakor koli komentiral v slovenskem znanstvenem in medijskem prostoru tolikokrat omenjenega dosežka na tem področju, čeprav bi ga morali že zaradi kontroverznosti z zadnjimi tujimi izsledki. Lani je namreč Irma Virant-Klun skupaj z Antoninom Bukovskym objavila v knjigi »Stem Cells in Human Reproduction« poglavje, v ka-

terem navaja, da so iz površine jajčnikov treh odraslih žensk s prezgodnjo odpovedjo jajčnika uspeli izolirati somatske matične celice jajčnika, ki so se v in vitro pogojih že v treh dneh razvile v oocite. Po osemenitvi s partnerjevim semenom so se iz teh celic razvili zarodki, ki so se razvijali do blastocistam podobnih tvorb. Le-te so zamrznili in jih nameravajo v primeru potrjene genetske normalnosti prenesti v maternico žensk (Bukovsky in Virant-Klun 2007). Kljub vsem naštetim argumentom, ki so bili objavljeni v strokovnem tisku in govorijo proti teoriji o neo-oogenezi, je to vseeno prvi objavljeni klinični poskus uspešne osemenitve človeškega oocita, nastalega iz matičnih celic v in vitro pogojih. Še predvsem je ta podatek zanimiv, saj so potemtakem procesi oogeneze, vključno z redukcijsko delitvijo (dokaz je haploidna jajčna celica) in brez sočasnega razvoja jajčnega folikla potekali v pičlih treh dneh.

Avtorja na osnovi svojih izsledkov poleg možnosti zdravljenja predčasne odpovedi jajčnika z omenjeno metodo navajata še možnosti zdravljenja različnih degenerativnih bolezni z uporabo matičnih celic jajčnika in avtologne celične terapije, saj se po njihovih navedbah ovarijske matične celice v njihovih poskusih uspejo pretvoriti tudi v nevrone (Bukovsky in sod. 2006a, 2007a).

Literatura

1. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004; 428: 145–50.
2. Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 2005; 122: 303–15.
3. Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadlyaya NB. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 20.
4. Bukovsky A, Virant-Klun I, Svetlikova M, Caudle MR. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 17–29.
5. Bukovsky A, Virant-Klun I, Svetlikova M, Wilson I. Ovarian germ cells. *Methods Enzymol* 2006; 41: 208–58.
6. Oktay K, Oktem O. Sustained endocrine function and spontaneous pregnancies after subcutaneous transplantation of cryopreserved ovarian tissue in stem cell transplant recipients. *Fertil Steril* 2005; 84 Suppl 1: 568.
7. Kerr JB, Duckett R, Myers M, Britt KL, Mladenovska T, Findlay JK. Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply. *Reproduction* 2006; 132: 97–111.
8. Sanders JE, Hawley J, Levy W, Gooley T, Buckner CD, Deeg HJ, et al. Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 87: 3045–52.
9. Byskov AG, Faddy MJ, Lemmen JG, Andersen CY. Eggs forever? *Differentiation* 2005; 73: 438–46.
10. Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, Kilen SM, Mayo KE, Shea LD, et al. Fate of the initial follicle pool: Empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility. *Dev Biol* 2006; 298: 149–54.
11. Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min IM, Wagers AJ. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature* 2006; 441: 1109–14.
12. Lee HJ, Selesniemi K, Niikura T, Klein R, Dombkowski DM, Tilly JL. Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescue long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3198–204.

13. Veitia RA, Gluckman E, Fellous M, Soulier J. Recovery of female fertility after chemotherapy, irradiation, and bone marrow allograft: further evidence against massive oocyte regeneration by bone marrow-derived germline stem cells. *Stem Cells* 2007; 25: 1334-5.
 14. Liu Y, Wu C, Lyu Q, Yang D, Albertini DF, Keefe DL, et al. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol* 2007; 306: 112-20.
 15. Bukovsky A, Virant-Klun I. Adult stem cells in the human ovary. In: Simon C, Pellicer A, eds. *Stem cells in human reproduction*. London: Informa Helthcare; 2007. p. 53-69.
 16. Bukovsky A, Copas P, Virant-Klun I. Potential new strategies for the treatment of ovarian infertility and degenerative diseases with autologous ovarian stem cells. *Expert Opin Biol Theor* 2006 a; 6: 341-65.
 17. Bukovsky A, Ayala ME, Dominquez R, Svetlikova M, Selleck-White R. Bone marrow derived cells and alternative pathways of oogenesis in adult rodents. *Cell Cycle* 2007 A; 6: 2306-9.
-