

Strokovni prispevek/Professional article

MATIČNE CELICE POVRŠINSKEGA EPITELIJA JAJČNIKA: OOGENEZA *IN VITRO*?

OVARIAN SURFACE EPITHELIUM STEM CELLS: OOOGENESIS *IN VITRO*?

Irma Virant-Klun¹, Primož Rožman², Branko Cvjetičanin³, Andrej Vogler¹,
Polona Klemenc², Elvira Maličev², Alojz Ihan⁴, Jasna Šinkovec⁵, Eda Vrtačnik-Bokal¹,
Tomaž Tomažević¹, Helena Meden-Vrtovec¹

¹ Klinični oddelek za reprodukcijo, Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana,
Šlajmerjeva 3, 1525 Ljubljana

² Center za imunohematologijo, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva 6,
1000 Ljubljana

³ Klinični oddelek za ginekologijo, Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana,
Šlajmerjeva 3, 1525 Ljubljana

⁴ Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4,
1000 Ljubljana

⁵ Patologija, Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Šlajmerjeva 2, 1525 Ljubljana

Izvleček

- Izhodišča** *Še vedno velja dogma, da je število foliklov in jajčnih celic ob rojstvu deklice dokončno in da vsak menstruacijski cikel dozori en folikel in ena jajčna celica iz obstoječe zaloge. Vse več je eksperimentalnih dokazov, da to najbrž ne velja. V površinskem epiteliju jajčnika so verjetno prisotne nediferencirane matične celice, ki se lahko tudi v odraslem obdobju življenja v jajčniku diferencirajo v jajčne celice. V tej raziskavi smo poskušali osamiti matične celice iz površinskega epitelija jajčnika in sprožiti nastajanje jajčnih celic (oogenezo) v celični kulturi jajčnika in vitro pri ženskah, ki nimajo naravno prisotnih foliklov in jajčnih celic v skorji jajčnika – pomenopavznih ženskah in ženskah s prezgodnjo menopavzo.*
- Metode** *Postrgali smo površinski epitelij jajčnika 20 pomenopavznih žensk in 5 žensk s prezgodnjim prenehanjem delovanja jajčnikov (prezgodnjo menopavzo). V suspenziji postrganih celic smo iskali potencialne matične celice. Potencialne matične celice smo dokazovali s transkripcijskimi označevalci Oct-4, Sox-2 in Nanog in s površinskim antigenom SSEA-4. Z dobljenimi celicami smo vzpostavili celično kulturo v gojišču DMEM/F-12 z dodanim barvilom fenol rdeče, ki ima šibko estrogensko delovanje. Celično kulturo smo gojili 20 dni v CO₂-inkubatorju pri 37 °C in 5-odstotnem CO₂. Opazovali smo razvoj celic v kulturi in poskušali z različnimi metodami – oceno morfološke, z analizo transkripcijskih označevalcev, z imunohistokemičnimi označevalci jajčnih celic in s pretočno citometrijo po barvanju s propidijevim jodidom ugotoviti, ali so prisotne jajčnim podobne celice.*
- Rezultati** *Pri vseh pomenopavznih ženskah in pri 4 ženskah s prezgodnjo menopavzo smo uspešno osamili iz površinskega epitelija jajčnika potencialne matične celice, ki so bile pozitivne za označevalce embrionalnih matičnih celic – Oct-4, Sox-2, Nanog in za površinski antigen SSEA-4. Pri teh ženskah smo uspešno vzpostavili celično kulturo jajčnika, v kateri so se na približno 5. dan gojenja razvile jajčnim podobne celice, pozitivne za transkripcijski označevalec Oct-4 in za imunohistokemične označevalce jajčnih celic – c-kit, Oct-4, ZP2, DAZL in celo meiotski označevalec SCP3. Označevalec SCP3 so izražale celice v celični kulturi*

Avtor za dopisovanje / Corresponding author:

Doc. dr. Irma Virant-Klun, univ. dipl. biol., Klinični oddelek za reprodukcijo, Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Šlajmerjeva 3, 1525 Ljubljana

pomenopavznih žensk, ne pa žensk s prezgodnjo menopavzo. Pretočna citometrija po barvanju celic s propidijevim jodidom je potrdila prisotnost haploidnih celic v celični kulturi jajčnika pomenopavznih žensk. Iz matičnih celic so se razvili tudi nekateri somatski tipi celic – fibroblasti, nevrom podobne celice in mioblastom podobne celice. Pri ženskah s prezgodnjo menopavzo so se jajčnim podobne celice razvile samo ob prisotnosti avtolognega seruma bolnice in predvsem ob prisotnosti seruma heterologne folikularne tekočine, ne pa ob prisotnosti telečjega seruma.

Zaključki *Prvi rezultati so spodbudni, saj kažejo fiziologijo jajčnika v povsem novi luči. V površinskem epiteliju jajčnika so prisotne potencialne matične celice embrionalnega značaja, ki se v pogojih in vitro razvijejo v jajčnim podobne celice in druge tipe celic. Potrebne so nadaljnje študije za boljše razumevanje novih spoznanj.*

Ključne besede *embrionalne matične celice; jajčna celica; kultura in vitro; površinski epitelij jajčnika*

Abstract

Background *The dogma that the total number of follicles and oocytes available for reproduction are determined at birth, and that one follicle and one oocyte are recruited from the existing pool to mature in each menstrual cycle still persists. There is an increasing experimental evidence that this might not be true. In the ovarian surface epithelium there might be non-differentiated stem cells that might differentiate into oocytes also in adult life. In this research we aimed at isolating putative stem cells from the ovarian surface epithelium and at evaluating in vitro oogenesis in the ovarian cell culture in vitro in women without naturally present follicles and oocytes in their ovarian cortex – postmenopausal women and women with premature ovarian failure.*

Methods *Ovarian surface epithelium was scraped from the ovaries of 20 postmenopausal women and 5 women with premature ovarian failure. We tried to find putative stem cells in ovarian scraping and to confirm them by transcription markers Oct-4, Sox-2, and Nanog, and by surface antigen SSEA-4. Cell culture was set up by scraped cells in DMEM/F-12 medium with phenol red, which shows a weak estrogenic activity. Ovarian cell culture was cultured for 20 days in a CO₂-incubator at 37 °C and 5 % CO₂. Development of cells in the culture was followed and the presence of oocyte-like cells was evaluated by using different methods – evaluation of morphology, transcription markers, surface antigen markers, oocyte immunohistochemical markers, and flow cytometry after propidium iodide staining.*

Results *In all postmenopausal women and in 4 out of the 5 women with premature ovarian failure putative stem cells were isolated from the ovarian surface epithelium, which were positive for transcription markers of embryonic stem cells Oct-4, Sox-2, Nanog, and for surface antigen SSEA-4. In all these women ovarian cell culture was successfully established. In all cultures oocyte-like cells developed approximately on day 5 of culture, which were positive for transcription marker Oct-4 and immunohistological germ cell markers c-kit, Oct-4, ZP2, DAZL, and even meiotic marker SCP3. Marker SCP3 was expressed in oocyte-like cells developed in ovarian cell culture of postmenopausal women, but not in patients with premature ovarian failure. Flow cytometry after propidium iodide staining revealed a population of potentially haploid oocyte-like cells in postmenopausal women. Stem cells developed also into some somatic cell types, including fibroblasts, neuron-, and mioblast-like cells. In patients with premature ovarian failure oocyte-like cells were developed only at the presence of autologous patient's serum and mostly at the presence of heterologous follicular fluid serum, whereas they did not develop at the presence of fetal calf serum.*

Conclusions *First results are promising as they indicate the new insight into the physiology of the adult human ovary. In the ovarian surface epithelium putative stem cells with embryonic character are present, which can develop into the oocyte-like cells and other types of cells in vitro. Further research is required to understand better these new findings.*

Key words *embryonic stem cells; in vitro culture; oocyte; ovarian surface epithelium*

Uvod

Že več desetletij prevladuje na področju reproduktivne medicine in biologije splošno sprejeta dogma, da je število foliklov in jajčnih celic pri deklici ob rojstvu dokončno. V odraslem obdobju življenja naj bi se v vsakem menstruacijskem ciklusu izbral iz zaloge foliklov en folikel, v katerem naj bi zrasla in dozorela ena jajčna celica, pripravljena na oploditev. Humani jajčnik naj bi se po stalni zalogi foliklov in jajčnih celic razlikoval od testisa, v katerem lahko spolne celice – spermiji nastajajo v vsem odraslem obdobju življenja. Eden glavnih zagovornikov te dogme je bil Zuckerman s sodelavci na podlagi štetja foliklov v jajčnikih.¹

Ta dogma pravzaprav ni bila nikoli eksperimentalno dokazana. Eden od razlogov za to je, da je humani jajčnik zelo težko raziskovati. *In vivo* študije so praktično nemogoče, vse do zdaj pa tudi ni bilo ustreznih *in vitro* metod, ki bi omogočale natančnejše raziskave fiziologije jajčnika.

Ves čas so dogmo močno kritizirali. Že zelo zgodaj, leta 1870 in 1917, sta Waldeyer in Kingery domnevala, da potekata oogeneza in obnova foliklov v odraslem jajčniku iz germinalnega epitelijskega jajčnika.^{2,3} Kingery je potrdil nastanek jajčnih celic iz površinskega epitelijskega odraslega jajčnika bele miši. Tudi ameriška pionirja moderne reproduktivne fiziologije – Allen in Evans – sta iz svojega eksperimentalnega dela na jajčnikih odraslih miši zaključila, da lahko nove jajčne celice nastajajo iz površinskega epitelijskega jajčnika v odraslem obdobju miši.^{4,5} Kljub močnemu nasprotovanju se je dogma ohranjala. Tudi v novejši literaturi lahko zasledimo vedno več teoretičnih kritik te dogme,⁶⁻⁹ vse več pa je tudi eksperimentalnih del, ki kažejo na to, da v odraslem humanem jajčniku morda tudi na novo nastajajo folikli oziroma jajčne celice. Veliko novega so prispevala spoznanja o matičnih celicah, predvsem na področju onkologije. Vedno več je dokazov, da agresivni ovarijski tumorji nastajajo s proliferacijo nediferenciranih matičnih celic jajčnika zaradi različnih dejavnikov okolja.¹⁰

Zelo verjetno tudi jajčne celice v jajčniku lahko nastanejo iz matičnih celic jajčnika.

Johnson in sodelavci iz Univerze Harvard, ZDA, so mlade, predpubertetne miši tretirali s toksičnim busulfanom, s čimer so uničili vse primordialne folikle v jajčniku, niso pa sprožili atrezije foliklov.¹¹ Kljub temu so bile v jajčniku istih, vendar odraslih živali prisotne celice, ki so bile zelo verjetno jajčne celice, saj so bile pozitivne za označevalec zgodnje meioze SCP3 (angl. *synaptonemal-complex protein 3*). Svoja opažanja so objavili v reviji *Nature*. Eno leto kasneje so objavili svoja nadaljnja opažanja pri miši. Verjetno da obstaja izvor jajčnih celic tudi zunaj jajčnika – v kostnem mozgu, zelo verjetno so to matične celice.¹² Kostni mozeg miši je bil namreč pozitiven za označevalce embrionalnih matičnih celic in jajčnih celic. Poleg tega so po transplantaciji kostnega mozga opazili nastajanje novih jajčnih celic pri prej steriliziranih odraslih miših. Predpostavlja se, da so v kostnem mozgu prisotne matične celice, ki se lahko tudi v odraslem jajčniku razvijajo v jajčne celice.

Wright in sodelavci so objavili,¹³ da so v površinskem epitelijskega jajčnika fetusa, novorojenke, in odraslega humanega jajčnika ugotovili veliko aktivnost encima telomeraze, značilnega za hitro proliferirajoče celice, predvsem matične celice. Parrott in sodelavci pa so v površinskem epitelijskega humanega in telečjega jajčnika ugotovili izraženost in aktivnost c-kit liganda/faktorja matičnih celic (angl. *stem cell factor*).¹⁴

Bukovsky s sodelavci iz Univerze Tennessee, ZDA, pa je prvi gojil površinski epitelij humanega jajčnika v gojišču za celično kulturo z dodanim barvilom fenol rdeče, ki ima šibko estrogensko delovanje. Postrgal je povrhnjico jajčnika pomenopavznih žensk, gojil celično kulturo in opazil poleg drugih celičnih tipov razvoj velikih celic, ki so bile pozitivne za različne označevalce jajčnih celic.¹⁵ Njegova teoretična spoznanja so nas močno pritegnila, saj se vsakodnevno srečujemo s težkimi oblikami ženske neplodnosti, kot sta prezgodnja menopavza in slab odziv jajčnikov na hormonsko spodbujanje v programu zunajtelesne oploditve. Neplodnost zaradi prezgodnje menopavze kot posledica genetskih nepravilnosti, predvsem pa še vedno neznanih razlogov, je ozdravljiva samo z zunajtelesno oploditvijo darovanih jajčnih celic. Podobno je z bolnicami, pri katerih kljub hormonskemu spodbujanju jajčnikov v postopku zunajtelesne oploditve zaradi večinoma nepoznanih dejavnikov pridobimo le 1 ali 2 jajčni celici slabe kakovosti. Nova spoznanja na področju matičnih celic jajčnika bi lahko bila v prihodnosti izjemnega pomena za zdravljenje najtežjih oblik ovarijsko pogojene neplodnosti.¹⁶⁻¹⁸

Namen našega dela je bil 1. postrgati površinski epitelij jajčnikov pri ženskah, ki naravno nimajo jajčnih celic in foliklov – pri pomenopavznih ženskah – in prvič tudi pri mladih bolnicah s prezgodnjo menopavzo; 2. poiskati potencialne matične celice; 3. vzgojiti celično kulturo in 4. opazovati morebitno oogenezo *in vitro*.

Bolnice in metode

V raziskavo smo vključili ženske brez naravno prisotnih foliklov in jajčnih celic v skorji jajčnika:

- 20 pomenopavznih žensk, starih 52 do 74 let, pri katerih so bili jajčniki odstranjeni zaradi različnih ginekoloških vzrokov, kot so na primer ciste ali preventivna odstranitev jajčnikov zaradi raka dojke; izključili smo ženske z ovarijskim tumorjem;
- 5 žensk s prezgodnjo menopavzo, starih od 28 let do 42 let, ki niso imele nobene poznane genetske nepravilnosti. V serumu so imele močno povišano raven folikel-spodbujajočega hormona (FSH). Vse pacientke so imele sekundarno amenorejo in atrofične jajčnike. Pri 4 pacientkah je bil vzrok prezgodnje menopavze nepoznan, pri 1 pacientki pa je bil posledica kirurške odstranitve ovarijskega endometrioma. Pri vseh teh pacientkah smo laparoskopsko postrgali povrhnjico jajčnika s tanko, fino ščetko, ne da bi pri tem ženska zakrvavela; ščetko smo sprali v sterilni fiziološki raztopini. Zatem je bila opravljena še diagnostična biopsija ter spiranje jajčnikov s sterilno, na telesno temperaturo ogreto fi-

ziološko raztopino in aspiracija tekočine iz Douglasa (dr. Andrej Vogler).

Vse pacientke so v raziskavi sodelovale prostovoljno. Bile so natančno obveščene o raziskavi in podpisale pisno soglasje za vključitev v raziskavo.

Pri vseh ženskah smo postrgali površinski epitelij jajčnika, iskali v dobljeni suspenziji celic potencialne matične celice, vzpostavili celično kulturo in spremljali razvoj jajčnim podobnih celic v pogojih *in vitro*.

Raziskavo sta odobrili tako Komisija za medicinsko etiko kot tudi Državna komisija za oploditev z biomedicinsko pomočjo.

Histološki pregled tkiva jajčnika

Pri vseh ženskah je bila na tkivu jajčnika opravljena klasična histološka ocena prisotnosti foliklov in jajčnih celic v skorji jajčnika po barvanju rezin s hematoxilin-eozinom in prisotnost površinskega epitelija jajčnika po barvanju s citokeratinom po že ustaljenih postopkih na Ginekološki kliniki v Ljubljani. Za oceno površinskega epitelija je bilo tkivo jajčnika fiksirano v formalinu in obdano s parafinom. Rezine z debelino 10 µm so bile nanese na predmetna stekelca za mikroskopiranje. Rezine so bile deparafinizirane in rehidrirane s potopitvijo stekelc v 0,01 M citratni pufer, pH 6,0, za 40 minut pri 98 °C. Nato so bila stekelca ohlajena na sobno temperaturo in inkubirana z mišjimi monoklonskimi protitelesi proti citokeratinu, clone 34bE12 (Dako, Glostrup, Danska), raztopljenimi v pufru PBS. Stekelca so bila sprana in inkubirana z zajčimi anti-mišjimi imunoglobulini z vezano peroksidazo. Peroksidaza je postala vidna z dodatkom raztopine diaminobenzidina po navodilih proizvajalca (Dako, Danska). Končno so bila stekelca dehidrirana, prevlečena s kanadskim balzomom, rezine pa opazovane pod svetlobnim mikroskopom. Celice površinskega epitelija so bile obarvane rjavo.

Iskanje potencialnih matičnih celic

V suspenziji celic, ki smo jih dobili s postrganjem površinskega epitelija jajčnika, smo med celicami epitelija iskali potencialne matične celice. Pod invertnim in navadnim svetlobnim mikroskopom smo na ogreti delovni površini pregledovali kapljice suspenzije celic pod povečavo 200-, 400- in 1000-krat. Osredotočili smo se na hipotetično majhne, okrogle celice z velikim jedrom.

Celična kultura

Po postrganju površinskega epitelija jajčnika smo v Laboratoriju za oploditev z biomedicinsko pomočjo Ginekološke klinike v Ljubljani vzpostavili kulturo jajčnika v gojišču DMEM/F-12 z dodanim barvilom fenol rdeče (Sigma, ZDA) in serumom. Uporabili smo podoben način gojenja celic jajčnika kot Bukovsky,¹⁵ vendar smo metodo tudi modificirali in izvirno izpopolnili. Poleg gojenja celic ob prisotnosti telečjega seruma smo celice gojili tudi ob prisotnosti inaktiviranega avtolognega seruma pacientke in ob prisotnosti seruma iz darovane folikularne tekočine, ki smo jo dobili v postopku zunajtelesne oploditve. Folikularno tekočino je po odstranitvi jajčnih celic s pisnim soglasjem daro-

vala pacientka z večjim številom foliklov/jajčnih celic, ki je v postopku zunajtelesne oploditve tudi zanosila. Pacientka je bila prej testirana na viruse HIV, hepatitis A in C in je bila dokazano neokužena.

Kulturo jajčnika smo gojili 20 dni v CO₂-inkubatorju (Haereus, Nemčija) na 37 °C in pri 5-odstotnem CO₂. Pri tem so se celice jajčnika pritrile na podlago v posodi za gojenje. Vsak dan smo kulturo jajčnika oziroma razvoj celic opazovali pod invertnim mikroskopom (Nikon, Japonska) pod povečavo 200 ali 400-krat. Jajčnim podobne celice smo opazovali morfološko, na podlagi velikosti (povprečni premer približno 100 µm), prisotnosti glikoproteinske ovojnice – zone pelucide in izločenega polarnega telesa. Na koncu gojenja celične kulture smo celice sprostili z encimom tripsin-EDTA (Sigma, ZDA). Suspenzijo celic smo analizirali na različne načine.

Analiza transkripcijskih označevalcev Nanog, Sox-2 in Oct-4, značilnih za embrionalne matične celice, z RT-PCR

Analiza transkripcijskih označevalcev potencialnih matičnih celic v suspenziji celic takoj po postrganju površinskega epitelija jajčnika in jajčnim podobnih celic v celični kulturi *in vitro* po 20 dneh gojenja je bila opravljena v Laboratoriju za imunohematologijo na Zavodu za transfuzijsko medicino Slovenije. Celokupna RNA je bila iz celic izolirana z RNeasy Mini Kit-om (Qiagen, Hilden, Nemčija). RT-PCR je bil izveden s SuperScript™ One-Step RT-PCR s Platinum™ Taq (Invitrogen, California, ZDA) po navodilih proizvajalca. Sekvence 'primerjev' za gen *Oct-4* so bile: 5'-gaggtattcagccaaacgac-3' in 5'-gttacagaaccacactcgga-3', za gen *Nanog*: 5'-tgcaaatgtcttctgctgagat-3' in 5'-gttcaggatgttgagagattc-3' in za gen *Sox-2*: 5'-atgcaccgctacgacgtga-3' in 5'-cttttgaccctccattt-3'. Z napravo Thermal Cycler 9700 Perkin Elmer so bili ustvarjeni naslednji pogoji delovanja: 50 °C za 30 minut za sintezo cDNA, 94 °C 2 minuti za predenaturacijo, 40 ciklov po 30 sekund pri 94 °C, 55–62 °C (odvisno od amplificiranega gena) za 30 sekund, 72 °C za 1 minuto in 72 °C za 10 minut za finalno ekstenzijo. Produkti PCR so bili nanoseni na 2-odstotni agarozni gel, ki je vseboval 0,5 mg/ml etidijevega bromida. Rezultati so bili spremljani glede na ustrežno velikost PCR produktov – 315 baznih parov za gen *Oct-4*, 285 baznih parov za gen *Nanog* in 437 baznih parov za gen *Sox-2*. Uporabili smo 2 negativni kontroli: vodo brez DNA-ze/RNA-ze in celokupno RNA izolirano iz stare kulture povsem diferenciranih, odraslih humanih hondrocitov. Za pozitivno kontrolo smo uporabili celokupno RNA, izolirano iz periferne krvi.

Analiza antigena SSEA-4, značilnega za embrionalne matične celice

Antigen SSEA-4 potencialnih matičnih celic v suspenziji celic takoj po postrganju površinskega epitelija jajčnika je bil analiziran s pretočno citometrijo na Zavodu za transfuzijsko medicino, Laboratorij za imunohematologijo. Sprane celice (5 × 10⁵) so bile inkubirane z mišjimi monoklonskimi protitelesi, specifič-

nimi za SSEA-4 (Abcam plc, Cambridge, Velika Britanija) 30 minut na ledu in v temi. Nato so bile celice sprane in inkubirane s FITC-konjugiranimi antičloveškimi IgG (H+L) protitelesi (Abcam plc, Cambridge, Velika Britanija) 30 minut v temi. Kontrolne vzorce smo obarvali z izotipskimi kontrolnimi protitelesi. Po spiranju smo celice analizirali s pretočnim citometrom FACSCalibur (BD Biosciences), pri čemer smo uporabili CellQuest (BD Biosciences) programski paket za analizo.

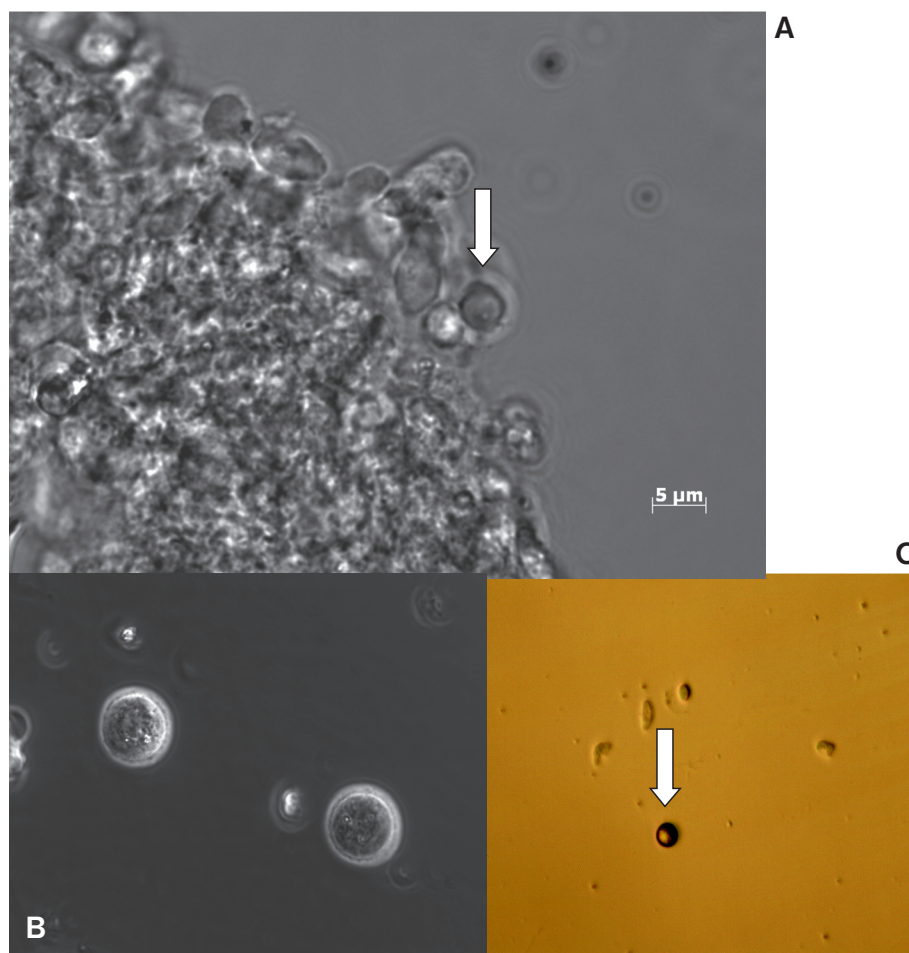
Imunohistokemična analiza označevalcev jajčnih celic

Imunohistokemične analize jajčnim podobnih celic po 20 dneh gojenja, ki smo jih vzgojili *in vitro*, so bile opravljene na Reproductive Genetics Institute Chicago, Illinois, ZDA (Dr. Nicolas Zech in Dr. Jury Verlinsky). Celice so bile analizirane na označevalce, značilne za zarodne celice. Celice, podobne jajčnim celicam, so bile po 20 dneh gojenja fiksirane v 4-odstotnem paraformaldehidu 30 minut, permeabilizirane z 0,1 % Triton-X, sprane in blokirane v PBS pufri, ki je vseboval normalni serum osla (sc-2044, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California). Uporabljene so bila primarna protitelesa za Oct-4 (sc-9081), c-kit (sc-1493), ZP2 (sc-23710), VASA (sc-48705), DAZL (sc-27332), TRA-60 (sc-21705), Tra-81 (sc-23710) in SCP3 (sc-33875) proizvajalca Santa Cruz Biotechnology, Inc. Celice so bile inkubirane s protitelesi preko noči na 4 °C. Nato so bile celice sprane in inkubirane 40 minut s FITC-konjugiranimi sekundarnimi protitelesi za označevanje germinalnih celic – c-kit, ZP2, VASA, DAZL, TRA-60 in TRA-81 in SCP3 in TRITC-konjugiranimi protitelesi za Oct-4. Hkrati so bila celična jedra obarvana s 4',6-diamidin-2-fenilidol (DAPI; modro). Za negativno kontrolo smo izključili primarna protitelesa iz prvega inkubacijskega postopka.

Pretočna citometrija za ugotavljanje količine DNA v celicah

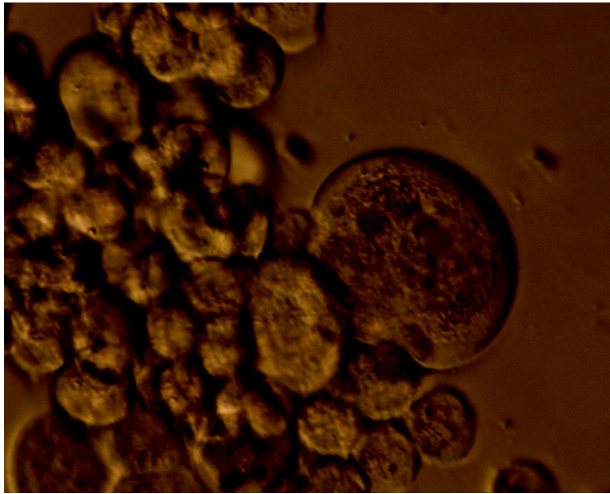
V celicah, sproščenih iz celične kulture jajčnika po 20 dneh gojenja, smo ugotavljali količino DNA (ploidi-

jo) s pretočno citometrijo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani. Za ugotavljanje količine DNA v celicah (ploidijske) je bil uporabljen Cycle TEST™ PLUS DNA Reagent Kit (Cat. No. 340242, Becton Dickinson) za pretočno citometrijo po proizvajalčevih navodilih. Metoda je vključevala raztapljanje membranskih lipidov celic z neionskim detergentom, odstranitev celičnega citoskeleta in jedrnih proteinov s tripsinom, razgradnjo celične RNA z encimom in stabilizacijo jedrnega kromatina s sperminom. Propidijev jodid je bil vezan na čista, izolirana jedra s procesiranjem na pretočnem citometru s sposobnostjo dvojne diskriminacije. S propidijevim jodidom obarvana jedra so oddajala fluorescenčno svetlobo z valovno dolžino med 580 in 650 nm. Uporabljen je bil detektor FACScan fluorescenca 2 (FL2), opremljen s 585/42 filtrom za analizo oddajane svetlobe z valovno dolžino 564 do 606 nm. Za kontrolo smo uporabili limfocite iz periferne krvi.



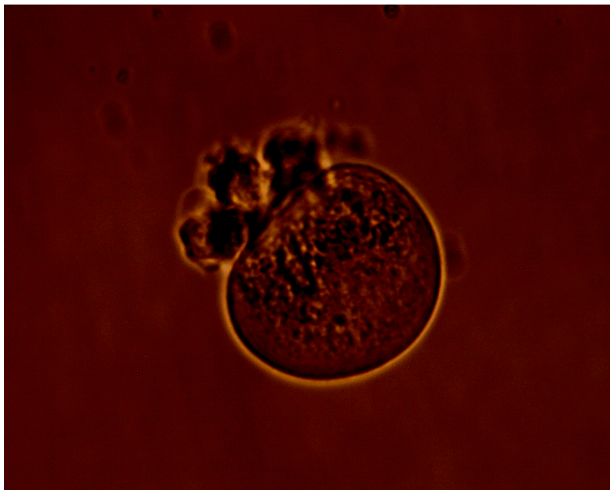
Sl. 1. Majhne, okrogle, še nedefinirane celice (puščica), ki smo jih našli v suspenziji celic po postrganju površinskega epitelijskega jajčnika med epitelijskimi celicami. (A: svetlobni mikroskop, povečava $\times 1000$. B: svetlobni mikroskop, povečava $\times 1000$. Slika C: invertni mikroskop, povečava $\times 400$).

Figure 1. Small, round, non-defined cells (arrow), which were found in ovarian surface epithelium scrapings among epithelial cells. (A: light microscope, magnification $\times 1000$. B: light microscope, magnification $\times 1000$. C: inverted microscope, magnification $\times 400$).



Sl. 5. Jajčni podobna celica med drugimi celicami (invertni mikroskop, povečava $\times 400$).

Figure 5. Oocyte-like cell among other cells (inverted microscope, magnification $\times 400$).

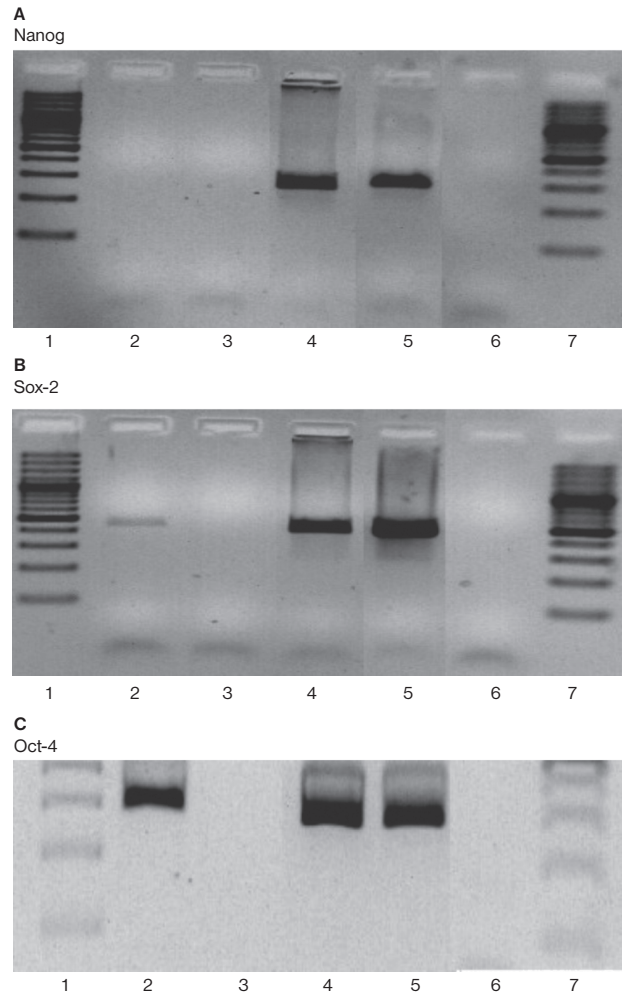


Sl. 6. Jajčni podobna celica (invertni mikroskop, povečava $\times 400$).

Figure 6. Oocyte-like cell (inverted microscope, magnification $\times 400$).

Transkripcijski označevalci, značilni za embrionalne matične celice

Še nepoznane celice v suspenziji celic, postrganih iz površinskega epitelijskega jajčnika, ki smo jih opisali zgoraj - matične celice so takoj po postrganju in tudi po 20 dneh gojenja *in vitro* izražale transkripcijske označevalce Oct-4, Sox-2 in Nanog. Izraženost genov je bila izrazitejša takoj po postrganju površinskega epitelijskega jajčnika, kot po 20 dneh gojenja (Sl. 7). Jajčnim celicam podobne celice so po 20 dneh gojenja izražale transkripcijski označevalce Oct-4.

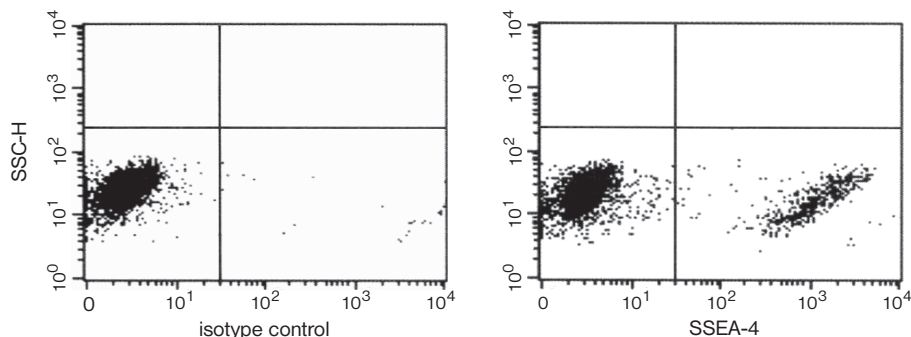


Sl. 7. Analiza transkripcijskih označevalcev z RT-PCR. A: za izraženost gena Nanog. B: za izraženost gena Sox-2. C: za izraženost gena Oct-4. Linija 1: molekularni označevalce; Linija 2: potencialne matične celice po 20-dnevnem gojenju; Linija 3: negativna kontrola (voda); Linija 4: pozitivna kontrola (periferna kri); Linija 5: potencialne matične celice takoj po postrganju površinskega epitelijskega jajčnika; Linija 6: negativna kontrola (stara kultura povsem diferenciranih hondrocitov *in vitro*); Linija 7: molekularni označevalce.

Figure 7. Transcription marker analysis by RT-PCR. A: for Nanog gene expression. B: for Sox-2 gene expression. C: for Oct-4 gene expression. Lane 1: molecular marker; Lane 2: isolated population of putative stem cells after 20 days of culture; Lane 3: no template control (water); Lane 4: positive control (peripheral blood); Lane 5: stem cells just after ovarian surface epithelium scraping; Lane 6: negative control (completely *in vitro* differentiated chondrocytes from an old cell culture); Lane 7: molecular marker.

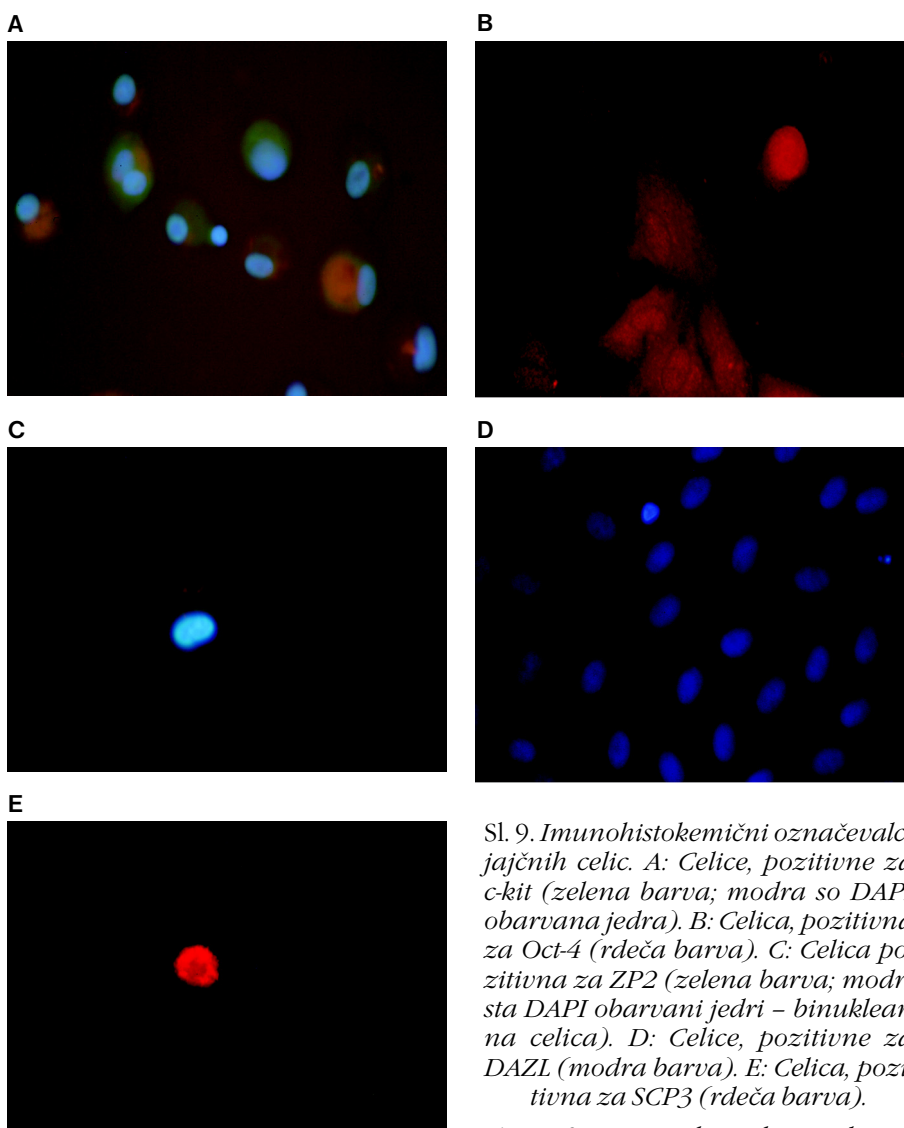
Površinski antigen SSEA-4, značilen za embrionalne matične celice

Po postrganju površinskega epitelijskega jajčnika so bile celice v suspenziji pozitivne na površinski antigen SSEA-4 (Sl. 8).



Sl. 8. Celice, postrgane iz površinskega epitelijskega jajčnika, antigen pozitivne za SSEA-4 pri pacientki s prezgodnjo menopavzo.

Figure 8. Cells, scraped from the ovarian surface epithelium and positive for SSEA-4 antigen in a patient with premature ovarian failure.



Sl. 9. Imunohistokemični označevalci jajčnih celic. A: Celice, pozitivne za c-kit (zeleno barvo; modra so DAPI obarvana jedra). B: Celica, pozitivna za Oct-4 (rdeča barva). C: Celica pozitivna za ZP2 (zeleno barvo; modri sta DAPI obarvani jedri – binuklearna celica). D: Celice, pozitivne za DAZL (modra barva). E: Celica, pozitivna za SCP3 (rdeča barva).

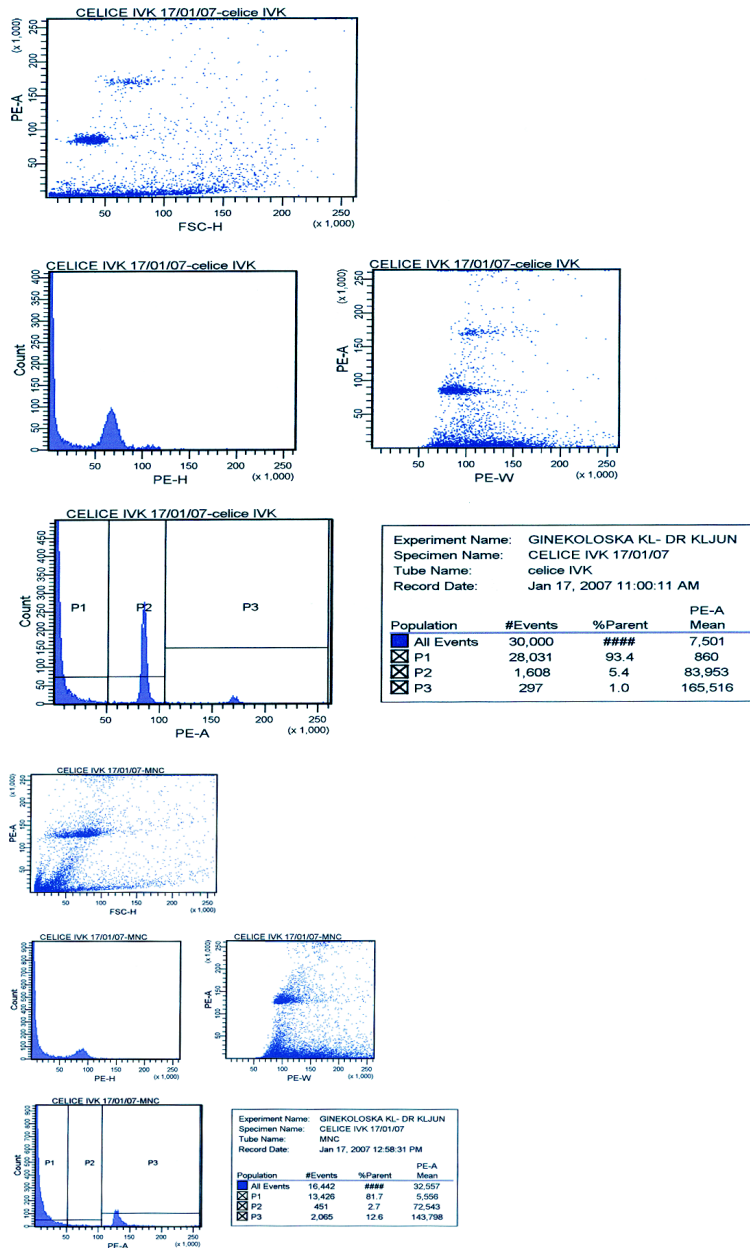
Figure 9. Immunohistochemical markers of oocytes. A: C-kit positive cell (green colour; nuclei stained by DAPI are blue). B: Oct-4 positive cell (red colour). C: ZP2 positive cell (green colour; two DAPI stained nuclei – binuclear cell). D: DAZL-positive cells (blue colour). E: Cell, positive for SCP3 meiotic protein).

Imunohistokemični označevalci, značilni za jajčne celice

V celični kulturi bolnic s prezgodnjo menopavzo so se razvile jajčnim podobne celice, ki so bile pozitivne za označevalce zgodnjih, še nezrelih jajčnih celic c-kit (Sl. 9A), Oct-4 (Sl. 9B) in ZP2 (Sl. 9C). V celični kulturi pomenopavznih žensk pa so se razvile jajčnim podobne celice, ki so bile pozitivne na označevalce c-kit, Oct-4, ZP2, pa tudi DAZL (Sl. 9D) in meiotični označevalec SCP3 (Sl. 9E).

Prisotnost haploidnih celic

S pretočno citometrijo smo v populaciji 30.000 celic, sproščenih iz celične kulture jajčnika pomenopavznih žensk, v primerjavi z diploidnimi perifernimi limfociti zaznali tudi populacijo celic s približno polovično količino DNA, kar je ustrezalo haploidnim celicam (Sl. 10).



Sl. 10. Analiza celic s pretočno citometrijo po barvanju s propidijevim jodidom. A: analiza celic iz celične kulture jajčnika – prisotnost populacije haploidnih in diploidnih celic. B: analiza limfocitov iz periferne krvi – prisotnost samo diploidnih celic.

Figure 10. Cell analysis by flow-cytometry after propidium iodide staining. A: analysis of cells released from the ovarian cell culture – presence of the population of haploid and diploid cells. B: analysis of lymphocytes from the peripheral blood – presence of diploid cells only.

Razpravljanje

Naše delo kaže, da so v površinskem epiteliju jajčnika žensk brez naravno prisotnih jajčnih celic in foliklov poleg epiteljskih celic prisotne tudi še nepoznane, nediferencirane celice, pozitivne na transkripcijske označevalce, značilne za embrionalne matične celice. Te celice se lahko v celični kulturi jajčnika razvijejo v različne tipe celic, predvsem v jajčnim podobne

celice, ki smo jih dokazali tako s transkripcijskimi označevalci kot tudi z imunohistološkimi označevalci za jajčne celice.

Gre za prvo študijo, ki z ustreznimi označevalci potrjuje potencialne embrionalne matične celice v odraslem humanem jajčniku. Mednarodna skupina strokovnjakov – 'Iniciativa za raziskave matičnih celic' je namreč ugotovila, da raziskavo 59 različnih linij humanih matičnih celic, izoliranih iz zarodkov, izraženost transkripcijskih označevalcev in antigenov, ki smo jih potrdili v naši raziskavi.¹⁹ Poleg tega naši rezultati potrjujejo rezultate Ratajczaka in njegove skupine, ki je dokazala zelo podobno populacijo matičnih celic z embrionalnim značajem v kostnem mozgu idr. tkivih odraslega človeka.^{20–22} Presenetljivo je, da tudi v odraslih tkivih človeka lahko najdemo matične celice z embrionalnim značajem. Označevalci kažejo na to, da so te celice enako pluripotentne in s tem sposobne diferenciacije v različne tipe celic tako kot celice, izolirane iz humanega zarodka. Če bo nadaljnje delo pokazalo, da je to res, ne bo več potrebno uničevati humanih zarodkov v raziskovalne namene in namene zdravljenja degenerativnih obolenj za potrebe reproduktivne medicine. Postavlja se hipoteza, da v telesu človeka ostane zaloga matičnih celic z embrionalnim značajem še iz zgodnjega embrionalnega obdobja življenja. Da gre res za embrionalne matične celice, sedaj postopno dokazujemo tudi z *in vitro* in na živalskem modelu tudi *in vivo* diferenciacijo celic v celice vseh treh kličnih linij (endoderm, mezoderm, ektoderm). Izraženost genov, značilnih za embrionalne matične celice, se je pri potencialnih matičnih celicah jajčnika med gojenjem manjšala, saj so bile v sistemu kokulture, primernem za diferenciacijo celic, ne pa v dediferenciacijskem gojišču, ki bi ohranjalo njihovo nediferenciranost in pluripotentnost. Kultura celic jajčnika se kaže kot zanimiva metoda za študij oogeneze in folikuloogeneze *in vitro*, pa tudi diferenciacije drugih tipov celic, na primer nevronov. Seto-Young s sodelavci je ugotovil, da so celice v celični kulturi jajčnika steroidno aktivne in se pri tem odzivajo na dodani inzulin in gonadotropine.²³ Gre za sistem kokulture celic jajčnika, v katerem si celice med seboj pomagajo pri diferenciaciji. Omenjeni sistem bi lahko predstavljal prednost pred klasičnim sistemom *in vitro* maturacije (IVM) nezreliz jajčnih celic v postopku zunajtelesne oploditve,²⁴ saj celice rastejo in se diferencirajo v prisotnosti drugih celic, ki jim pri tem pomagajo. Opazili smo, da se jajčnim podobne celice razvijajo v prisotnosti fibrobla-

stov. To bi morda lahko razložili z dejstvom, da fibroblasti vsebujejo encim aromatazo, ki sodeluje pri pretvorbi hormonov steroidov v estrogene.²⁵ Poleg tega fibroblasti sproščajo tudi rastni faktor (bFGF), pomemben za rast in razvoj drugih celic.²⁶

Že več študij je pokazalo, da se nediferencirane matične celice lahko razvijejo v jajčne celice v pogojih *in vitro*. Novak s sodelavci je objavila v reviji *Stem Cells*, da se mišje embrionalne matične celice lahko v laboratorijskih pogojih razvijejo v jajčnim podobne celice, ki so pozitivne za mejotski označevalec SCP3; le-ta pa kaže nenormalno porazdelitev v jedru in nepovezanost s kromosomi.²⁷ Fluorescenčna hibridizacija *in situ* (FISH) je pokazala, da v jedrih teh celic ni bilo za mejozo značilne sinaptične organizacije homolognih kromosomov, temveč organizacija kromosomov, značilna za somatske celice. Poleg tega so bile omenjene zarodne celice negativne za druge proteine - označevalce mejoze, kot so SCP1, SCP2, STAG3 (angl. *stromal antigen 3*), REC8 (angl. *meiotic protein similar to the rad21 cohesins*) in SMC1 (angl. *structural maintenance of chromosomes-1*)-beta. Novak s sodelavci je zaključila, da opažene celice, podobne jajčnim, ne napredujejo v procesu mejoze.

Za razliko od Novakove je Lacham-Kaplan s sodelavci iz mišjih embrionalnih celic v posebnem gojišču za podporo celične kulture testisa (angl. *testicular conditioned medium*) vzgojila posebne strukture, podobne foliklom, ki so vsebovale jajčne celice brez ovojnice - zone pellucide, pozitivne za različne označevalce izraženosti genov, značilnih za spolne celice: *Oct-4*, *Mvh*, *c-kit*, *Stella* in *DAZL*.²⁸ V foliklom podobnih strukturah so zaznali tudi izraženost genov, značilnih za jajčne celice - *Fig alpha* in *ZP* (angl. *zona pellucida*).

Zelo presenetljivo je spoznanje Dannerja s sodelavci, ki je v reviji *Molecular Human Reproduction* objavil, da se odrasle matične celice iz pankreasa pri človeku, pozitivne za označevalce matičnih celic *Oct-4*, nestin in *SSEA-1*, lahko v celični kulturi spontano razvijejo v jajčne celice, ki kažejo izraženost mejotskih proteinov SCP3 in *DMC1*.²⁹ To potrjuje opažanja Johnsenja,¹² da obstajajo matične celice kot izvor jajčnih celic tudi izven jajčnika. Da so v epitelijski plasti tudi matične celice, ki se lahko razvijejo v jajčnim podobne celice, pa potrjujejo tudi spoznanja, ki jih je objavil Dyce s sodelavci.³⁰ Ugotovili so namreč, da se v celični kulturi kože prašičjega fetusa razvijejo foliklom podobne strukture, v katerih so bile velike, jajčnim podobne celice. Foliklom podobne strukture so izločale estradiol in progesteron ter se odzivala na dodajanje gonadotropinov. Jajčnim celicam podobne celice so bile pozitivne za mejotski označevalec SCP3 in označevalce za zono pellucido. Nekatere od jajčnim podobnih celic so se razvile v strukture, podobne partenogenetskemu zarodkom.

Naši rezultati so v nasprotju z opažanji Liua s sodelavci, ki so z različnimi molekularno genetskimi metodami ugotovili, da v humanem jajčniku ni matičnih celic in na novo nastajanja jajčnih celic.³¹ Poudariti je potrebno, da so se pri svojem delu osredotočili na skoraj jajčnika, mi pa na njegov površinski epitelij.

Pri pomenopavznih ženskah smo z imunohistološkimi označevalci dokazali, da so bile jajčnim podobne celice bolj zrele; pozitivne so bile na zgodnji mejotski označevalec SCP3 in pretočna citometrija je potrdila tudi prisotnost haploidnih celic. Pri ženskah s prezgodnjo menopavzo smo z imunohistološkimi označevalci potrdili jajčnim podobne nezrele celice na zgodnejših razvojnih stopnjah, ki so se optimalno razvijale ob prisotnosti seruma heterologne folikularne tekočine. To bi lahko razložili z zelo bogato biokemično sestavo folikularne tekočine, ki vsebuje tudi različne poznane in še neznane snovi, pomembne za rast in dozorevanje jajčnih celic.

Razvoj jajčnih celic iz matičnih celic jajčnika do sedaj še ni bil dokazan, kot tudi niso bile dokazane matične celice jajčnika. Naše raziskave kažejo, da so v površinskem epiteliju odraslega humanega jajčnika prisotne embrionalne matične celice, ki se lahko v pogojih *in vitro* diferencirajo v različne tipe celic, vključno z jajčnim podobnimi celicami.

Zaključki

Naše delo kaže, da so v površinskem epiteliju jajčnika žensk brez naravno prisotnih jajčnih celic in foliklov - pomenopavznih žensk in žensk s prezgodnjo menopavzo poleg epitelijskih celic prisotne tudi do sedaj še neopisane, nediferencirane celice. Te celice so pozitivne za transkripcijske označevalce *Oct-4*, *Sox-2* in *Nanog*, značilne za embrionalne matične celice. Prav tako so pozitivne za površinski antigen *SSEA-4*, značilen za embrionalne matične celice. V celični kulturi jajčnika se te celice spontano razvijejo v različne tipe celic, predvsem v jajčnim podobne celice. Nekatere celice, ki se razvijejo v celični kulturi, so tako po velikosti kot tudi po morfologiji zelo podobne jajčnim celicam, so pozitivne za transkripcijski označevalec *Oct-4* in za imunohistološke označevalce, značilne za jajčne celice - *c-kit*, *Oct-4*, *ZP2*, *DAZL* in *SCP3*. S pretočno citometrijo smo potrdili prisotnost haploidnih celic v celični kulturi. Nujno je nadaljnje delo. Poskušamo nadalje dokazati pozitivnost jajčnim podobnih celic za različne mejotske označevalce in ugotoviti njihov genetski status ter diferenciacijo teh celic v celice vseh treh ključnih linij *in vitro* in *in vivo* na živalskem modelu. Dosedanji rezultati so zelo spodbudni, saj kažejo fiziologijo jajčnika povsem v novi luči. Kaže, da iz površinskega epitelijskega jajčnika lahko izoliramo matične celice z embrionalnim značajem. To je pomembno, saj kaže na to, da embrionalnih matičnih celic ni mogoče dobiti samo iz humanega zarodka, temveč tudi iz humanega jajčnika. Poudariti pa je potrebno, da je do potencialne klinične uporabe matičnih celic jajčnika za zdravljenje ovarijske neplodnosti ali za potrebe regenerativne medicine še zelo zelo daleč in bo potrebno še ogromno trdega interdisciplinarnega dela.

Zahvala

Pri naših raziskavah sodelujejo: prof. dr. Antonin Bukovsky, University Tennessee, ZDA, dr. Jury Verlinsky, Reproductive Genetics Institute Chicago, ZDA, dr. Nico

las Zech, Institute for Reproductive Medicine and Endocrinology, Bregenz, Austria, doc. dr. Miomir Knežević, univ. dipl. biol., Zavod za transfuzijsko medicino Slovenije, Ljubljana, in doc. dr. Bojana Pinter, dr. med., in ne nazadnje celotno osebje – zdravniki, biologi in medicinske sestre skupine za oploditev z biomedicinsko pomočjo Ginekološke klinike, Univerzitetni klinični center Ljubljana. Vsem se iskreno zahvaljujemo.

Literatura

- Zuckerman S. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Prog Horm Res* 1951; 6: 63–109.
- Waldeyer W. *Eirstock und Ei*. Leipzig, Germany: Engelmann; 1870.
- Kingery HM. Oogenesis in the white mouse. *J Morph* 1917; 30: 261–315.
- Allen A. Ovogenesis during sexual maturity. *Am J Anat* 1923; 31: 439–81.
- Evans HM, Swezy O. Ovogenesis and the normal follicular cycle in adult mammalia. *Mem Univ Calif* 1931; 9: 119–224.
- Byskov AG, Addy MJ, Lemmen JG, Andersen CY. Eggs forever? *Differentiation* 2005; 73: 438–46.
- Hutt KJ, Albertini DF. Clinical applications and limitations of current ovarian stem cell research: a review. *J Exp Clin Assist Reprod* 2006; 27: 3–6.
- Liu Y, Wu C, Lyu Q, Yang D, Albertini DF, Keefe DL, Liu L. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol* 2007 (Epub ahead of print).
- Skaznik-Wikiel M, Tilly JC, Lee HJ, Niikura Y, Kaneko-Tarui T, Johnson J, Tilly JL. Serious doubts over »Eggs forever«? *Differentiation* 2007; 75: 93–9.
- Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, Dinulescu DM, Connolly D, Foster R, et al. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 11154–9.
- 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.
- 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.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996; 18: 173–9.
- Parrott JA, Kima G, Skinner MK. Expression and action of Kit Ligand/stem cell factor in normal human and bovine ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Biology of Reproduction* 2000; 62: 1600–9.
- Bukovsky A, Svetlikova M, Caudle MR. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 17.
- 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 Ther* 2006; 6: 341–65.
- Bukovsky A, Virant-Klun I, Svetlikova M, Willson I. Ovarian germ cells. *Methods Enzymol* 2006; 419: 208–58.
- Bukovsky A, Virant-Klun I. Adult stem cells in the human ovary. In: Carlos S, Pellicer C, eds. *Stem cells in human reproduction*. London, New York, Melbourne, Singapore: Informa Healthcare; 2006. p. 53–69.
- The International Stem Cell Initiative, Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, et al. Characterisation of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 803–16.
- Ratajczak MZ, Machalinski B, Wojakowski W, Ratajczak J, Kucia M. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia* 2007; 21: 860–7.
- Kucia M, Zuba-Surma E, Wysoczynski M, Dobrowolska H, Reca R, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Physiological and pathological consequences of identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in adult bone marrow. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 5–18.
- Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, Baskiewicz-Masiuk M, Moldenhawer S, Zuba-Surma E, et al. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4 + very small embryonic-like cells purified from human cord blood: preliminary report. *Leukemia* 2007; 21: 297–303.
- Seto-Young D, Leonardi O, Park A, Holcomb K, Salehi M, Chang P, et al. Hormonally active nontransformed human ovarian cell culture from oophorectomy specimens: methods of development and initial characterization. *Horm Res* 2005; 64: 238–47.
- Mikkelsen AL. Strategies in human in-vitro maturation and their clinical outcome. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 593–9.
- Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45: S116–S124.
- Lavranos TC, Rodgers HF, Bertonecello I, Rodgers RJ. Anchorage-independent culture of bovine granulosa cells: the effects of basic fibroblast growth factor and dibutyryl cAMP on cell division and differentiation. *Exp Cell Res* 1994; 211: 245–51.
- Novak I, Lightfoot DA, Wang H, Eriksson A, Mahdy E, Hoog C. Mouse embryonic stem cells from follicle-like ovarian structures but do not progress through meiosis. *Stem Cells* 2006; 24: 1931–6.
- Lacham-Kaplan O, Chy H, Trounson A. Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. *Stem Cells* 2006; 24: 266–73.
- Danner S, Kajahn J, Geismann C, Klink E, Kruse C. Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. *Mol Hum Reprod* 2007; 13: 11–20.
- Dyce PW, Wen L, Li J. In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 384–90.
- Liu Y, Wu C, Lyu Q, Yang D, Albertini DF, Keefe DL, Liu L. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol* 2007; 306: 112–20.

Prispelo 2007-05-24, sprejeto 2007-09-07