



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта :

IN VITRO МАТУРАЦИЈА ЈАЈНИХ ЋЕЛИЈА И ДЕРИВАЦИЈА ПЛУРИПОТЕНТНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА

Кључне речи :

јајна ћелија, матичне ћелије, диференцијација

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

Након рођења, сваки јајник садржи негде око 500,000 примордионалних фоликула и јајне ћелије које су аретриране у профазу I мејозе. За време пубертета и сазревања жене, под утицајем хормона кохорте јајних ћелија расту, доспевају у фазу герминалног везикула (GV), прогресију хромозома од метафазе I (MI) до телофазе I и екструзије поларног теласца. Друга мејотичка деоба доводи јајну ћелију у MII фазу која је дефинисана као заврсна фаза у развоју и матурацији једра и цитоплазме јајне цлије. In vitro матурација (IVM) јајних ћелија је сигуран и ефикасан процес где незреле јане ћелије добијене од нестимулираних јајника матурирају под лабораторисјким условима.

Ова процедура спречава хормонску стимулацију јајника скупим и по здравље штетним гонадотропинима, спречава незелење ефекте овариалне хиперстимулације. Насупрот томе, предности IVM јајних ћелија су умањена фреквенција працења развоја фоликула и краци третман у поређењу са садасњим методама in vitro фертилизације (IVF). Ова техника обухвата групу пацијената који пате од полицистичног овариалног синдрома, жене које после рутинске IVF имају ембрионе лосег квалитета или жене које слабо реагују на хормонску терапију. Јајне ћелије после IVM се могу замрзнути и тако сачувати за евентуалну IVF или донацију у науцне сврхе.

Ово омогућује да се из одбацених јаника након хируршког третмана добију јајне ћелије које ће се или оплодити или активисати партеногенетским путем како би се из њих изоловале плурипотентне матичне ћелије.



Циљ истраживања

Циљеви овог истраживања су:

- 1) побољшање технике IVМ јајних ћелија, испитивање њиховог морфолошког, генетског и развојног профила тј. потенцијала након вештачке оплодње или партеногенетске активације;
- 2) замрзавање јајних ћелија;
- 3) замрзавање здравог јајног ткива ради очувања истог пре радио- или хемотерапије.

Актуелност истраживања

По рођењу, женско дете има у сваком јајнику негде око 500,000 примордиалних фоликула. Током репродуктивног зивота само мали број фоликула а самим тим и јајних ћелија це сазрети. Сазревање или матурација јајних ћелија је реињицирање и комплетирање прве мејотицке деобе од GV до МII стадијума [1]. Цитоплазматични протеини [2], MPF фактор [3] и цитостатични фактори регулису прогрес од GV до МII стадијума. Јајне ћелије добивене од великих фоликула показују већу мејотичку зрелост, потенцијал за оплодњу и каснији рани ембрионални развој [4]. Како под ин виво условима јајна ћелија има оптималне услове да сазри тако је побољшање тих услова под *in vitro* условима неопходан како би се олакшала евентуална вантелесну оплодња пацијента или добијање матичних ћелија од оплођених или партенотских ембиона [5-7]. Медијуми који се користе за IVМ јајних ћелија су комплексни медијуми и то углавном TCM 199, Хам'с Ф-10 или Ченгов медијум са бикарбонатом или -2-хидроксиетилпиперазин-Н-2-етансулфоницом киселином и са додатком серума и хормона (ЛХ, ФСХ и естрадиола). На тај начин се добија IVМ рата од 80% које су у 63% случајева оплођене [8] нарочито после примене интрацитоплазматичне ињекције сперматозоида (ICSI техника).

Који пацијенти су погодни за IVМ? Жене са овулаторним полицистичним јајницима, жене са неовулаторним полицистичним овариелним синдромом које имају мултипле фоликуле, жене које желе да замрзну јајне ћелије за каснију вантелесну оплодњу, жене које из здравствених разлога морају на радио- или хемотерапију, жене које имају лоше реагују хормонску суперстимулацију, жене којима се одстрањује један јајник, углавном пацијенти који пате или ће патити од инфертилитета [8, 9]. Једна посебна група пацијената су жене које имају рак/тумор, а које преосетљиво реагују на хормонску стимулацију. Способност да се из дела или читавог одстрањеног јајника изврши IVМ и криопрезервација јајних ћелија одржава репродуктивну способност и таквих пацијената јер и тако добивено ткиво јајника може се искористити за изоловање јајних ћелија, IVМ/IVF, криопрезервацију самог ткива, јајних ћелија или добивених ембриона [9].



**Предмет и опис истраживања,
задачи, методологија, очекивани резултати:**

Овај пројекат има за циљ коришћење одстрањених делова јајника, добивени након хируршке интервенције, како би се из њих изоловале незреле јајне ћелије. Оне ће служити као изворни материјал за побољшање услова за њихову IVМ као и извор за добијање специфичних линија плурипотентних матичних ћелија. После пунктирања фоликула са 19Г иглом и додатног сецења (ткз. слицинг) јајног ткива, материјал се скупља и пере у 0,9% физиолоском раствору обогаћеним са 2 интернационалне јединце хепарина. Јајне ћелије се перу филтрирајући узорак у специјалним ембриофилтерима и тразе користећи стереолупу. Незреле јајне ћелије се стављају у петри шољу (Нунц) и медијум који садржи 75 mU/mL FSH и LH (Пергонал, Сероно) на 37°C у атмосфери која има 5% CO₂ и влажност ваздуха од 95%. Прогрес матурације се проверава 24 и 48 сати након почетка *in vitro* третмана. Јајне ћелије се ослобађају од кумулуса и гранулоза ћелија и зреле јајне ћелије које се препознају по присуству екструдираних поларног теласца се одвајају за IVF или ICSI [8, 9] или за партеногенетску активацију путем калцијумјонофора [10]. Након овог третмана ооците се пребацују у медиум (Медицулт) како би се након 18 часова пратион проценат оплодње или активације јајне ћелије. Присуство два пронуклеуса и два поларна теласца су знак да је јајна ћелија успешно оплођена. Оплођене или активирани јајне ћелије се чувају 4 до 6 дана након IVF или активације, евентуално добивени рани ембриони (аретирани, моруле или стадијуми бластоцисте) се користе за добијање и комплетну карактеризацију ембрионалних матичних ћелија [7, 11]. Ембриони се најпре ослободе зоне пелуциде и ставе на фибробластне ћелије [12]. Њихов раст се прати свакодневно и уколико се примети стварање примарне колоније, та колонија се пребаци на свеже фибробласте у ES медиум који садржи 10% замене за серум (SR, Инвитроген) и 8 ng/ml bFGF (Инвитроген).

Њихова пролиферација ће бити праћена параленим замрзавањем дела популације ћелија на -196°C и чување у течном азоту. Остали део ће се користити за доказивање присуства типичних маркера плурипотенције: SSEA3, SSEA4, TPA-1-60, TRA1-81, OCT4, NANOG, REH1, SOH, hTERT [13]. Епигенетски и генетски профил добивених плурипотентних линија ће се поредити у колаборацији са домаћим евентуално иностраним сарадницима коришћењем *microarray* и *ChIP on Chip* методама [14]. Потенцијал диференцирања плурипотентних ћелија ће се проверавати под *in vitro* условима ради демонстрације да су ћелије способне да дају ћелије ектодермалног, мезодермалног и ендодермалног типа [15].

Значај истраживања

Значај истраживања је вишеструк, јер обухвата клиничку и научну примену: побољшање IVМ јајних ћелија добивених из одбаценог материјала омогућује њену каснију примену у терапији стерилитета са умањеним трошковима по пацијента. IVМ метода омогућава краћи период праћења развоја фоликула, краци IVF третман, жена не мора да чека више од 2-3 месеци између два IVF третмана. Поред тога не постоји незелењени ефекти медикаментације, посебно изазивање овариално хиперстимулисајућег синдрома. Додатни значај овог пројекта је студирање биологије и физиологије јајне ћелије укључујући оптимизацију услова IVМ као и добијање плурипотентних линија матичних ћелија било из оплођених или партенотских ембриона.



Временски оквир

Првих шест месеци су потребни за стварање услова за добијање зрелих јајних ћелија, других шест месеци за добијање оплођених и партенотских ембриона као и за изолацију матичних ћелија.

Литература

1. Cha KY, Chian RC. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. Hum Reprod Update 1998;4:103-120
2. Gerhart J, Wu M, Kirschner M. Cell cycle dynamics of an M phase specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. J Cell Biol 1984;98:1247-1255
3. Hashimoto N, Kishimoto T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation promoting factor during mouse oocyte maturation. Dev Biol 1988;126:242-252
4. Chian RC, Chung JT, Downey BF *et al.* Maturation and developmental competence of immature oocytes retrieved from ovaries at different phases of folliculogenesis: bovine model study. RBM Online 2002;4:127-132
5. Cibelli J, Cunniff K, Vrana KE. Embryonic stem cells from parthenotes. Methods Enzymol 2006;418:117-135.
6. Choudhary M, Haimes E, Herbert M *et al.* Demographic, medical and treatment characteristics associated with couples' decisions to donate fresh spare embryos for research. Hum Reprod 2004;19:2091-2096.
7. Zhang X, Stojkovic P, Przyborski D *et al.* Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. STEM CELLS 2006;24:2669-2676.
8. Tan SL, Child TJ, Gulekli B. *In vitro* maturation and fertilization of oocytes from unstimulated ovaries: predicting the number of immature oocytes retrieved by early follicular phase ultrasonography. Am J Obstet Gynecol 2002;186:684-689.
9. Rao GD, Chian RC, Son WS *et al.* Fertility preservation in women undergoing cancer treatment. Lancet 2004;1829.
10. Stojkovic M, Stojkovic P, Leary C *et al.* Derivation of a human blastocyst after heterologous nuclear transfer to donated oocytes. RBM Online 2005;11: 226-231.
11. Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L *et al.* The international stem cell initiative. Characteristics of human embryonic stem cell lines: results from the International Stem Cell Initiative. Nature Biotechnol 2007;25: 803-816.
12. Stojkovic P, Lako M, Stewart R *et al.* An autogeneic feeder-system that efficiently supports undifferentiated growth of human embryonic stem cells. STEM CELLS 2005;23:306-314.
13. Armstrong L, Hughes O, Young S *et al.* The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NF κ B signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. Hum Mol Genet 2006;15:1894-1913.
14. Allegrucci C, Wu YC, Denning CN *et al.* Extensive epigenetic variation in DNA methylation between and within human embryonic stem cell lines. Hum Mol Genet 2007;16:1253-1268.
15. Choudhary M, Zhang X, Stojkovic P *et al.* Putative role of hyaluronan and its related genes, HAS2 and RHAMM in human early preimplantation embryogenesis and embryonic stem cell characterization. STEM CELLS (in press).



Руководилац пројекта:

проф. др Миодраг Стојковић

Главни истраживач:

проф. др Миодраг Стојковић

Ангажовани истраживачи:

проф. др Слободан Арсенијевић

проф. др Оливера Ђорђевић

асс. др Данијела Тодоровић

асс. Биљана Љујић

асс. др Дарко Грујичић

асс. др Марија Шолак