

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Jerica ŽAGAR

**VPLIV POSTOPKA VITRIFIKACIJE IN ZORENJA
IN VITRO NA IZRAŽENOST
TRANSKRIPCIJSKEGA FAKTORJA FIGLA V
HUMANI JAJČNI CELICI**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Jerica ŽAGAR

**VPLIV POSTOPKA VITRIFIKACIJE IN ZORENJA *IN VITRO* NA
IZRAŽENOST TRANSKRIPCijskega FAKTORJA FIGLA V
HUMANI JAJČNI CELICI**

Magistrsko delo
Magistrski študij – 2. stopnja

**IMPACT OF VITRIFICATION AND *IN VITRO* MATURATION ON
EXPRESSION OF TRANSCRIPTION FACTOR FIGLA IN HUMAN
OOCYTE**

M. Sc. Thesis
Master Study Programmes

Ljubljana, 2018

Magistrsko delo predstavlja zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje – Molekulska in funkcionalna biologija. Delo je bilo opravljeno na Kliničnem oddelku za reprodukcijo Ginekološke klinike, Univerzitetni klinični center Ljubljana.

Študijska komisija študija Molekulske in funkcionalne biologije je dne 20. 1. 2017 za mentorico napisane magistrske naloge imenovala prof. dr. Irmo Virant-Klun in za recenzenta prof. dr. Marka Krefta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Petra GOLJA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Irma VIRANT-KLUN

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Član: prof. dr. Marko KREFT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Jerica Žagar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
DK UDK 618.177(043.2)
KG neplodnost/TF FIGLA/ humana jajčna celica/vitrifikacija/IVM/vplivi
AV ŽAGAR, Jerica, dipl. biol. (UN)
SA VIRANT-KLUN, Irma (mentorica)/KREFT, Marko (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij molekulske in funkcionalne biologije
LI 2018
IN VPLIV POSTOPKA VITRIFIKACIJE IN ZORENJA *IN VITRO* NA IZRAŽENOST TRANSKRIPCIJSKEGA FAKTORJA FIGLA V HUMANI JAJČNI CELICI
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP XIII, 69 str., 21 sl., 1 pril., 42 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Razlog za neplodnost pri ženskah je včasih lahko tudi slabša kvaliteta jajčnih celic in njihov nepravilni razvoj. Transkripcijski faktor (TF) FIGLA vpliva na tvorbo zone pelucide (ZP) jajčne celice in je vključen v pomembne procese kot sta oogeneza in folikulogeneza. V že opravljenih raziskavah so številni znanstveniki potrdili, da postopki krioprezervacije in zorenja *in vitro* (IVM) vplivajo na strukturo, delovanje in genetiko jajčne celice, vendar pa v literaturi še ni podatkov o vplivih postopkov zunajtelesne oploditve (IVF) na izražanje TF FIGLA v jajčnih celicah. Ker se neplodnost pogosto zdravi s postopki IVF in ker je za nepravilen razvoj jajčnih celic in posledično neplodnost lahko vzrok tudi neizražanje oziroma spremenjeno izražanje TF FIGLA, nas je zanimalo, če in kako postopki IVM, vitrifikacije/devitrifikacije in počasnega zamrzovanja in odmrzovanja vplivajo na izražanje TF FIGLA v skupinah humanih jajčnih celic. Vse celice v raziskavi smo, po določeni metodi, ki se uporablja za IVF, imunocitokemično označili za TF FIGLA in opazovali razlike v vzorcu in jakosti izražanja FIGLA faktorja. Rezultati so pokazali pomembne razlike med jajčnimi celicami, tako v vzorcu izražanja v posameznih celicah kot v jakosti in vzorcu izražanja med skupinami jajčnih celic glede na njihovo zrelost in našete postopke. Na podlagi tega lahko sklepamo, da imajo postopki IVF vpliv na izražanje tega pomembnega TF, ni pa še znano, ali je ta vpliv posreden ali ne, za kar so potrebne še nadaljnje raziskave.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 618.177(043.2)
CX infertility/TF FIGLA/human oocyte/vitrification/IVM/effects
AU ŽAGAR, Jerica
AA VIRANT-KLUN, Irma (supervisor)/KREFT, Marko (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programmes of Molecular and Functional Biology
PY 2018
TI IMPACT OF VITRIFICATION AND *IN VITRO* MATURATION ON EXPRESSION OF TRANSCRIPTION FACTOR FIGLA IN HUMAN OOCYTE
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XIII, 69 p., 21 fig., 1 ann., 42 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Sometimes female infertility can be a consequence of poor quality of oocytes or their irregular development. Transcription factor (TF) FIGLA has an impact on the formation of zona pellucida (ZP) and is included in important processes like oogenesis and folliculogenesis. In previous studies, many scientists have confirmed that cryopreservation and *in vitro* maturation (IVM) procedures affect the structure, function and genetics of oocytes, but in literature, there is no information yet on the impact of *in vitro* fertilisation (IVF) procedures on the expression of TF FIGLA in human oocytes. Treatment of infertility with IVF procedures and the fact that irregular oocyte development and infertility can depend on non-expression or changed expression of TF FIGLA, made us wonder if and how the procedures of IVM, vitrification/devitrification and slow freezing and warming affect the expression of TF FIGLA in different groups of human oocytes. All cells included in our research were, according to a specific procedure used for IVF, immunocytochemically marked as TF FIGLA and then the differences in pattern and strength of TF FIGLA expression were observed. The results showed some significant differences between oocytes: in their expression pattern in a singular cell and also in the expression of strength and pattern between different groups of cells, considering their maturity and previously mentioned procedures. Based on that, we can assume that IVF procedures affect the TF FIGLA expression, yet it is still unknown if these effects are indirect or not, for which further research is needed.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 CILJI NALOGE.....	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 HUMANA JAJČNA CELICA.....	4
2.1.1 Razvoj jajčne celice	5
2.1.2 Razvojna genetika jajčne celice	6
2.1.3 Jajčne celice, pridobljene za metode asistirane reprodukcije.....	7
2.1.4 Proteomika jajčne celice	9
2.2 NEPLODNOST PRI ŽENSKAH	11
2.2.1 Učinki protirakavih terapij na reproduktivno sposobnost pacientk.....	11
2.2.2 Metode ohranjanja plodnosti pri ženskah	12
2.3 TRANSKRIPCIJSKI FAKTOR FIGLA	14
2.3.1 Karakterizacija gena za transkripcijski faktor FIGLA	14
2.3.2 Mesta izražanja gena <i>FIGLA</i>	18
2.3.3 Transkripcijski faktor FIGLA in folikulogeneza.....	19
2.3.4 Posledice mutacij gena za transkripcijski faktor FIGLA.....	20

2.3.5 Časovni okviri izražanja transkripcijskega faktorja FIGLA	22
2.3.6 Vpliv transkripcijskega faktorja FIGLA na ostale gene jajčne celice	23
2.4 KRIOPREZERVACIJA JAJČNIH CELIC	26
2.4.1 Razlogi za krioprezervacijo jajčnih celic	27
2.4.2. Vplivi vitrifikacije na strukturo jajčne celice	28
2.4.3 Vplivi vitrifikacije na delovanje jajčne celice	30
2.4.4 Vpliv vitrifikacije na zono pelucido	36
2.4.5 Vpliv vitrifikacije na epigenetiko jajčne celice	37
2.4.6 Vplivi vitrifikacije na uspešnost oploditve	39
2.5 <i>IN VITRO</i> ZORENJE JAJČNIH CELIC	39
2.5.1 Uspešnost metode zorenja <i>in vitro</i>	40
2.5.2 Vpliv zorenja <i>in vitro</i> na jajčno celico	41
2.6 FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA IN IMUNOLOKALIZACIJA	42
3 MATERIAL IN METODE	44
3.1 PRIDOBITEV HUMANIH JAJČNIH CELIC	44
3.1.1 Protokol hormonske hiperstimulacije jajčnikov z antagonisti GnRH	44
3.1.2 Protokol hormonske hiperstimulacije jajčnikov z blagimi antagonisti GnRH	44
3.1.3 Protokol hormonske hiperstimulacije jajčnikov z agonisti GnRH	44
3.2 VITRIFIKACIJA HUMANIH JAJČNIH CELIC S CRYOTOP POSTOPKOM ...	45
3.3 DEVITRIFIKACIJA HUMANIH JAJČNIH CELIC	46
3.4 <i>IN VITRO</i> ZORENJE HUMANIH JAJČNIH CELIC	47
3.5 POČASNO ZAMRZOVANJE IN ODMRZOVANJE JAJČNIH CELIC	47
3.6 IMUNOCITOKEMIJA HUMANIH JAJČNIH CELIC	48
3.7 OPAZOVANJE IZRAŽANJA TRANSKRIPCijskega faktorja FIGLA V HUMANI JAJČNI CELICI S FLUORESCENČNO MIKROSKOPIJO	48

4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	50
4.1 SVEŽE JAJČNE CELICE	50
4.2 JAJČNE CELICE, DOZOREVANE <i>IN VITRO</i>	53
4.3 DEVITRIFICIRANE JAJČNE CELICE	55
4.4 ODMRZNJENE JAJČNE CELICE.....	56
4.5 NEGATIVNA KONTROLA	58
4.6 PRIMERJAVA IZRAŽENOSTI PROTEINA FIGLA V ZRELIH IN NEZRELIH JAJČNIH CELICAH.....	59
4.7. VPLIV RAVNANJA V POSTOPKU ZUNAJTELESNE OPLODITVE NA IZRAŽENOST PROTEINA FIGLA V JAJČNIH CELICAH	61
5 SKLEPI	63
6 POVZETEK.....	64
7 VIRI	66
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO SLIK

- Slika 1: Oploditev ženske spolne celice – jajčne celice z moško spolno celico – spermijem, ki skozi žarkasto korono in ZP preide do jedra ženske spolne celice..... 4
- Slika 2: Zorenje jajčne celice v jajčnikovem ciklu. Jajčnikov cikel se začne z zorenjem jajčnikovega folikla in se zaključi z ovulacijo ter rastjo in propadom rumenega telesca 6
- Slika 3: Oogeneza. Ženske spolne celice nastanejo z mitozo in mejozo. S prvo mejotsko delitvijo dobimo sekundarno jajčno celico s polarnim telescem. Z drugo mejotsko delitvijo ena hčerinska celica postane jajčna celica, ki ima eno do tri polarna telesca. Polarna telesca se nato razgradijo in dobimo eno zrelo jajčno celico..... 7
- Slika 4: Dve sveži jajčni celici. Nezrela (profaza I) jajčna celica z GV (levo) in zrela (MII) jajčna celica z lepo vidnim polarnim telesom in ZP, ki obdaja celotno celico. Citoplazma je po celotni jajčni celici fino zrnata (invertni mikroskop)..... 8
- Slika 5: DNA in predvideno zaporedje AK pri človeški *FIGLA* cDNA, pridobljeni eksperimentalno. Kodirajoče regije so napisane z velikimi tiskanimi črkami, neprevedene regije pa z malimi tiskanimi črkami. Meje eksona so označene znotraj črnih navpičnih linij, predhodno določene meje med eksonoma 3 in 4 pa so označene s prekinjeno navpično črto. Dodatna eksonska sekvenca je v odebeljenem tisku. Močno ohranjene regije so označene s poševnimi črtami preko zaporedja (\), HLH motiv pa s sivim obarvanjem in poševno oznako (/)..... 16
- Slika 6: (a) Genomska struktura zaporedja gena *FIGLA* pri človeku. Prikazani sta prej objavljena in trenutna eksperimentalna intron/ekson struktura, s pričakovanimi produkti. (b) Meje med eksoni in introni na novem zaporedju eksonov. Zaporedja eksonov so v velikih tiskanih črkah, zaporedja intronov pa v malih tiskanih črkah. Novo zaporedje eksona je v odebeljenem tisku. Nov STOP kodon je podčrtan. (c) Potrditev *FIGLA* mRNA strukture. S primerji F2/R1 so dobili produkt iz 537 bp iz vzorcev zarodnih (fetal – Fe) in odraslih (adult – Ad) RT+ cDNA jajčnikov, ne pa iz RT± kontrol (lanes 1 and 4). Markerji (M) so 100 bp zaporedja (Promega, UK) 17

- Slika 7: Primerjava zaporedja proteina FIGLA pri človeku, miših, podganah in ribi medaki. Aminokislinski ostanki, ohranjeni pri vseh vrstah so označeni s sivo. Regiji »basic« in HLH, ki sta močno ohranjeni pri obeh vrstah sta označeni s podpisom, z * pa je označeno ohranjeno TRS fosforilacijsko območje..... 18
- Slika 8: Dve sveži nezreli jajčni celici (levo in desno). Leva jajčnica celica kaže atipično sliko genetskega materiala oziroma GV tik pod površino; v predelu genetskega materiala je protein FIGLA manj izražen. Na levi jajčni celici je protein FIGLA nekoliko bolj skoncentriran na periferiji jajčne celice, na desni jajčni celici pa lahko opazimo zrnca proteina tudi v centralnem delu jajčne celice 51
- Slika 9: Dve sveži zreli jajčni celici (levo in desno). Pri obeh je videti modro obarvan genetski material na dveh delih: v jajčni celici in v polarnem telesu. V levi jajčni celici je bil protein manj izražen, tudi v zrcih. V desni jajčni celici je v celoti protein bolj izražen, vendar se periferno na dveh mestih opazi manjša izraženost proteina FIGLA, opazna pa je tudi delna izraženost proteina v ZP..... 51
- Slika 10: Sveži zreli jajčni celici (levo in desno). Pri obeh jajčnih celicah je protein FIGLA močno izražen in bolj skoncentriran v centralnem delu kot na obrobni . 52
- Slika 11: Dve sveži zreli jajčni celici (levo in desno). Pri obeh jajčnih celicah je protein FIGLA močno izražen. Pri levi jajčni celici opazimo nekoliko manjšo izraženost proteina FIGLA na obrobju. Pri desni jajčni celici opazimo rahlo izraženost proteina FIGLA tudi v ZP jajčne celice. Pri desni jajčni celici opazimo tudi modro obarvan genetski material v glavici semenčice 52
- Slika 12: Dve sveži zreli jajčni celici (levo in desno). Pri obeh jajčnih celicah je protein FIGLA močno izražen, rahlo tudi v ZP. Pri obeh jajčnih celicah opazimo tudi modro obarvan genetski material v glavicah semenčic 53
- Slika 13: Dve nezreli jajčni celici, ki sta bili zorjeni *in vitro*, a nista dozoreli (levo in desno). Pri obeh lahko opazimo bolj koncentriran protein ob genetskem materialu v centralnem delu; protein je skoncentriran tudi v zrcih, ki se pojavljajo v bližini genetskega materiala oziroma GV..... 54
- Slika 14: Zrela jajčna celica, ki je dozorela v postopku IVM. Protein FIGLA je bolj izražen v centralnem delu jajčne celice okrog genetskega materiala. Modro se je pobarval tudi genetski material v glavi semenčice 54
- Slika 15: Nezrela, devitificirana jajčna celica, ki močno izraža protein FIGLA, a je ta rahlo nehomogeno razporejen po celici 55

Slika 16: Zrela, devitrificirana jajčna celica.....	55
Slika 17: Dve zreli, devitrificirani jajčni celici (levo in desno) z močnim izražanjem proteina FIGLA, ki je bil homogeno razporejen po vsej jajčni celici. Na levi jajčni celici se je obarval tudi genetski material v glavicah spermijev.....	56
Slika 18: Tri nezrele, odmrznjene jajčne celice (dve zgoraj in ena spodaj). Pri vseh treh jajčnih celicah je protein FIGLA relativno malo izražen in to specifično, v nitkah, ki so bolj skoncentrirane v perifernem delu jajčne celice.....	57
Slika 19: Tri zrele odmrznjene jajčne celice z močnim izražanjem proteina FIGLA, ki je bil enakomerno razporejen po vsej celici (ena zgoraj in dve spodaj) in bistveno bolj izražen kot pri nezrelih jajčnih celicah na sliki 18. Pri dveh jajčnih celicah (zgoraj in desno spodaj) se je rahlo obarvala tudi ZP. Pri jajčni celici desno spodaj se je modro obarval tudi genetski material v glavicah semenčic	58
Slika 20: Negativna kontrola: dve nezreli jajčni celici, barvani samo s sekundarnimi protitelesi (levo) in DAPI (desno).	59
Slika 21: Primerjava izraženosti proteina FIGLA glede na zrelost jajčnih celic. V nezrelih jajčnih celicah se je manj izražal kot v zrelih jajčnih celicah ne glede na metodo ravnanja v programu zunajtelesne oploditve. Protein FIGLA je bil izražen v ZP nekaterih zrelih jajčnih celic in pri nobeni od nezrelih jajčnih celic. Pri več nezrelih jajčnih celicah je bil protein FIGLA bolj izražen v obrobem delu celice, med tem ko je bil pri več zrelih celicah bolj izražen v centralnem delu jajčne celice, okrog genetskega materiala, ali pa homogeno razporejen po vsej celici.	61

KAZALO PRILOG

Priloga A: Soglasje Komisije za medicinsko etiko za raziskavo vpliva postopkov
zunajtelesne oploditve na kakovost jajčnih celic

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Pomen
AK	aminokislina
ATP	angl. <i>adenosine triphosphate</i> / slov. adenzin trifosfat
bHLH	angl. <i>basic helix-loop-helix</i>
bp	bazni par
BS	angl. <i>basic solution</i> / slov. osnovna raztopina
Ca ²⁺	kalcij
cDNA	angl. <i>complementary DNA</i> / slov. komplementarna DNA
CG	angl. <i>cortical granule</i> / slov. kortikalne granule
CO	angl. <i>fresh control oocytes</i> / slov. sveže kontrolne jajčne celice
COH	angl. <i>controlled ovarian hyperstimulation</i> / slov. hormonska hiperstimulacija jajčnikov
CTSB	katepsin B
DCF	angl. <i>dichlorofluorescein</i> / slov. diklorofluorescein
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	angl. <i>deoxyribonucleic acid</i> / slov. deoksiribonukleinska kislina
DS	angl. <i>diluent solution</i> / slov. redčitvena raztopina
ED	angl. <i>embryonic day</i> / slov. embrionalni dan
EFP	angl. <i>elective fertility preservation</i> / slov. izbirno ohranjanje plodnosti
EG	etilen glikol
EGF	angl. <i>epidermal growth factor</i> / slov. epidermalni rastni faktor
ES	angl. <i>equilibration solution</i> / slov. ekvilibracijska raztopina
FAD	flavinadenindinukleotid
FBS	angl. <i>fetal bovine serum</i> / slov. telečji serum
FIGLA	angl. <i>Folliculogenesis Specific bHLH Transcription Factor</i> / slov. za folikulogenezo specifičen bHLH transkripcijski faktor
FSH	folikel spodbujajoči hormon
FST	folistatin
GA	Golgijev aparat
GnRH	angl. <i>gonadotropin-releasing hormone</i> / slov. hipotalamični sproščevalni hormon gonadotropinov
GSH	citoplazemski glutation
GV	germinalni vezikel
HCG	angl. <i>human chorionic gonadotropin</i> / slov. humani horionski gonadotropin
ICSI	angl. <i>intracytoplasmic sperm injection</i> / slov. metoda neposrednega vnosa semenčice v jajčno celico
IGF	angl. <i>insuline-like growth factor</i> / slov. inzulinu podoben rastni faktor
IVF	angl. <i>in vitro fertilization</i> / slov. zunajtelesna oploditev

IVM	angl. <i>in vitro maturation</i> / slov. zorenje <i>in vitro</i>
LH	luteinizirajoči hormon
MAR	metode asistirane reprodukcije
MAS	mejozoaktivirajoči steroli
mRNA	angl. <i>messenger RNA</i> / slov. informacijska RNA
MTH	mitohondrij
M-SER	skupki mitohondrijev in gladkega endoplazmatskega retikuluma
MV	kompleksi mitohondrijev in veziklov
MI	metafaza I (metafaza 1. mejotske delitve)
MII	metafaza II (metafaza 2. mejotske delitve)
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
ND	angl. <i>neutral density</i>
OBMP	oploditev z biomedicinsko pomočjo
PBS	fosfatni pufer
PCOS	angl. <i>polycystic ovary syndrome</i> / slov. sindrom policističnih jajčnikov
PF	primordialni folikel
PFA	paraformaldehid
POF	angl. <i>premature ovarian failure</i> / slov. prezgodnja odpoved jajčnikov
PVS	angl. <i>perivitelline space</i> / slov. perivitelinski prostor
rFSH	rekombinantni FSH
RNA	angl. <i>ribonucleic acid</i> / slov. ribonukleinska kislina
ROS	angl. <i>reactive oxygene species</i> / slov. reaktivne kisikove zvrsti
RS	Republika Slovenija
SFO	angl. <i>slow frozen/thawed oocytes</i> / slov. počasi zamrznjene/odmrznjene jajčne celice
TE	angl. <i>Trophectoderm</i> / slov. trofoblast
TF	transkripcijski faktor
TS	angl. <i>thawing solution</i> / slov. raztopina za odmrzovanje
VO	angl. <i>vitriified/warmed oocytes</i> / slov. vitrificirane/devitificirane jajčne celice
VS	angl. <i>vittrification solution</i> / slov. vitifikacijska raztopina
WS	angl. <i>washing solution</i> / slov. raztopina za spiranje
wt	angl. <i>wild type</i> / slo. osnovna oblika
ZP	zona pelucida

1 UVOD

Številni kompleksni evkarionti, med katere spadamo tudi ljudje, izvirajo iz ene same celice – oplojene jajčne celice (Sadava in sod., 2006). Razmnoževanje človeka je proces, kjer združitev moške (semenčice) in ženske spolne celice (oocita, jajčne celice) pomeni začetek razvoja novega organizma (Virant-Klun in sod., 2002).

Za zanositev in rojstvo otroka je pomembno, da pri ženski v rodnem obdobju normalno delujejo vsi organi in organski sistemi, ki so udeleženi v tem procesu. Širom po svetu je ženska neplodnost vse bolj razširjena, glavne vzroke zanjo pa predstavljajo organske napake in motnje, pogosto pa tudi okolje (Virant-Klun in sod., 2002)

Najučinkovitejša rešitev za neplodnost je danes zunajtelesna oploditev (angl. *in vitro fertilization* – IVF). Zaradi težke dostopnosti človeških jajčnih celic za raziskave, pa je informacij o molekularnih osnovah zorenja jajčne celice in razvoja zarodkov pri ljudeh izredno malo. Študije na živalskih modelih nam dajejo pregled preko dinamičnih sprememb v genski ekspresiji tekom predimplantacijskega razvoja in zagotavljajo pomembne podatke za nadaljnje raziskave (Zhang in sod., 2007).

Za večje razumevanje regulacije zgodnje oogeneze človeka so potrebne analize ekspresije genov, specifično ali vsaj prvotno preko faz razvoja (Huntriss in sod., 2002). Zelo malo je namreč znanega o molekularnih mehanizmih, ki vodijo do začetka formacije foliklov in uravnavanja njihovega zorenja (Soyal in sod., 2000). Majhnost in omejena dostopnost človeških ovarijskih foliklov, jajčnih celic in predimplantacijskih zarodkov (embrijev) zahteva natančne molekularne tehnike, ki zagotavljajo največjo možno količino informacij (Huntriss in sod., 2002).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Postopki zamrzovanja jajčnih celic in njihovega shranjevanja v tekočem dušiku imajo vedno večji pomen pri ohranjanju reproduktivnega potenciala pri mladih onkoloških bolnicah. Zadnjih nekaj desetletij so napredki v onkoloških terapijah pripeljali do povečane stopnje preživetja pri onkoloških bolnikih, zlasti pri ženskah v njihovem reproduktivnem obdobju. Kljub izboljšavam terapij, lahko nekatera kemoterapevtska zdravila in radiacijska terapija vodijo v prezgodnjo odpoved jajčnikov (POF) in tako močno vplivajo na plodnost teh žensk (Nurudeen in sod., 2016). Za ohranjanje reproduktivnega potenciala je zelo uspešna metoda IVF, ki vključuje hormonsko stimulacijo jajčnikov, pridobivanje jajčnih celic, oploditev in nato prenos zarodka (svežega ali odmrznjenega) v maternico (Levine in sod., 2010).

Za pridobitev jajčnih celic ali zarodkov (v primeru, da ima pacientka partnerja) za krioprezervacijo, je potrebna kontrolirana hormonska stimulacija jajčnikov, začetek

katere uskladijo s fazami menstrualnega ciklusa (De Vos in sod., 2014). Vse pogosteje uporabljena metoda za krioprezervacijo, ki je alternativna počasnemu zamrzovanju je vitrifikacija, ki je že bila uspešno uporabljena za ohranjanje človeških blastocist in jajčnih celic v tekočem dušiku (Fabbri in sod., 2016). V postopku pridobivanja jajčnih celic za metode asistirane reprodukcije (MAR) običajno dobimo več zrelih jajčnih celic, del jajčnih celic pa predstavljajo nezrele jajčne celice, ki niso sposobne oploditve (Čížek-Sajko in sod., 2007). Nezrele jajčne celice lahko dozorimo *in vitro* v posebnem gojišču, zarodke, ki se razvijejo pa oploditvi pa prenesemo v maternico ali zamrznemo za kasnejši prenos v maternico (Virant-Klun in sod., 2002). *In vitro* zorenje (IVM) nezrelih jajčnih celic je pomembno pri onkoloških pacientkah, katerih jajčne celice shranjujemo, saj vsaka nezrela jajčna celica pomeni izgubo in manjšo verjetnost kasnejše zanositve; nezrele jajčne celice namreč nimajo naravne danosti oploditve.

Eden izmed dejavnikov za neplodnost pri ženskah je tudi neizražanje ali nepravilno izražanje transkripcijskega faktorja (TF) FIGLA (angl. *Folliculogenesis Specific basic helix-loop-helix Transcription Factor*) ali Factor In the Germline alpha (tudi FIG α), ki regulira ekspresijo številnih genov, značilnih za jajčne celice, vključno z geni, ki kodirajo proteine zone pelucide (ZP) – ZP1, ZP2 in ZP3 in je bistven za folikulogenezo. Izolirali so ga že iz ovarijskih foliklov, zrelih jajčnih celic in predimplantacijskih zarodkov (Huntriss in sod., 2002). Vpliva na formiranje primordialnega folikla (PF), njegovo neizražanje pa ima za posledico lahko tudi POF oz. prezgodnjo menopavzo (Tosh in sod., 2014). Ekspresija gena *FIGLA* poteka tudi v testisih, vendar ne vpliva na plodnost odraslih moških osebkov, ki so kljub neizražanju proteina FIGLA normalno plodni. Transkripcijski faktor (TF) FIGLA torej ni ključen za moško reprodukcijsko funkcijo (Huntriss in sod., 2002).

Za ohranjanje plodnosti onkoloških pacientk sta tako zelo pomembna postopka vitrifikacije in IVM, ni pa še znano, kako ta dva postopka vplivata na izraženost TF FIGLA v jajčni celici in posredno tudi na njeno kakovost.

1.2 CILJI NALOGE

Namen magistrskega dela je bil ugotoviti, če in kako postopki vitrifikacije – devitrifikacije, počasnega zamrzovanja – odmrzovanja in IVM jajčnih celic vplivajo na izraženost TF FIGLA v jajčnih celicah. S pomočjo fluorescenčne mikroskopije smo se v grobem osredotočili na kvalitativno imunocitokemijsko primerjavo oziroma analizo jakosti in lokacije izražanja proteina FIGLA (torej izražanje in predvsem razporeditev proteina FIGLA v jajčnih celicah) med devitrificiranimi, odmrznjenimi in IVM jajčnimi celicami v primerjavi s kontrolnimi humanimi jajčnimi celicami, to je svežimi zreliimi jajčnimi celicami, ki so dozorele v jajčnikih, a se niso oplodile po postopku IVF oziroma svežimi, nezrelimi jajčnimi celicami, ki so bile pridobljene iz jajčnikov kot

nezrele. Predpostavljamo, da bi lahko ta faktor postal pomemben pokazatelj kakovosti jajčnih celic v postopku IVF in dejavnik optimizacije postopkov zorenja jajčnih celic *in vitro* in vitrifikacije oziroma počasnega zamrzovanja jajčnih celic v programu IVF.

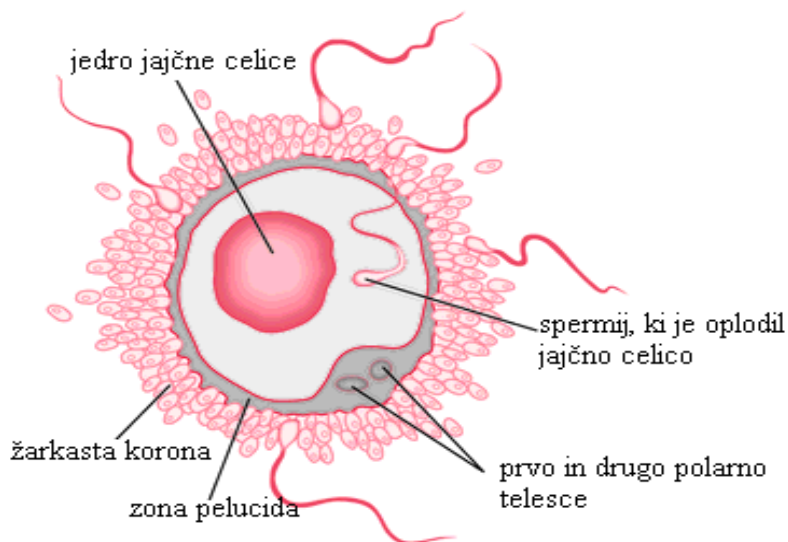
1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da se bo izražanje proteina FIGLA razlikovalo med jajčnimi celicami, ki so prešle oziroma preživele postopek vitrifikacije – devitifikacije, počasnega zamrzovanja – odmrzovanja ali IVM in bo drugačno kot pri svežih zrelih oziroma nezrelih jajčnih celicah.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HUMANA JAJČNA CELICA

Ženske gamete, imenovane jajčne celice, so velike in negibljuje celice (Sadava in sod., 2006), ki se ob ovulaciji sprostijo iz jajčnika ženske. Sama celica vsebuje dovolj hrane za nastanek novega živega organizma in spada med največje celice živih organizmov, saj meri približno 10-krat toliko kot somatske celice (Virant-Klun in sod., 2002), tj. v premeru okrog 110 do 115 μm . Jajčna celica je sestavljena iz citoplazme, ki jo imenujemo tudi ooplazma, jedra, ki vsebuje dedni material in celičnih organelov, ki omogočajo normalno delovanje celice. Celična membrana, ki obdaja celico je prekrita z ZP, to je glikoproteinska ovojnica z receptorji za vezavo spermija (Virant-Klun, 2004). Zona pelucida (ZP) obdaja jajčne celice sesalcev in zgodnji zarodek in je tesno vpletena v komunikacijo med jajčno celico in granuloznimi celicami, ki jo obdajajo v razvijajočem se foliklu (Joone in sod., 2016). Ta glikoproteinska struktura igra glavno vlogo pri številnih pomembnih bioloških procesih v oogenezi in oploditvi (Slika 1), npr. pri interakciji med spermijem in jajčno celico med oploditvijo (Choi in sod., 2017), pri indukciji akrosomske reakcije in preprečevanju polispermije (Joone in sod., 2016). Pomembno vlogo ima tudi pri razvoju oplojene jajčne celice in zaščiti jajčne celice in zgodnjega zarodka pred infekcijami bakterijskih in glivičnih agensov v reproduktivnem traktu pred vgnezditevijo v steno maternice oziroma endometriju. Delno zaprto mikrookolje znotraj ZP je naravno okolje zarodnih celic od totipotentne do pluripotentne (npr. zigota – blastocista) faze (Choi in sod., 2017).



Slika 1: Oploditev ženske spolne celice – jajčne celice z moško spolno celico – spermijem, ki skozi žarkasto korono in ZP preide do jedra ženske spolne celice
(<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/fertilized+egg+cell>).

Med oolemo in ZP je s tekočino napolnjen perivitelinski prostor (PVS), ki predstavlja rezerve hranilnih snovi (Virant-Klun in sod., 2002). Vse skupaj obdaja masa foliklovih celic, imenovana kumulus (*cumulus oophorus*) (Virant-Klun, 2004), njegovo notranjo stran pa predstavlja žarkasta korona ali *corona radiata* (Virant-Klun in sod., 2002), ki jo sestavljajo celice zrnatega sklada jajčnikovega folikla - granulose. Sam proces razvoja jajčne celice se imenuje oogeneza in poteka v foliklu (Virant-Klun, 2004).

2.1.1 Razvoj jajčne celice

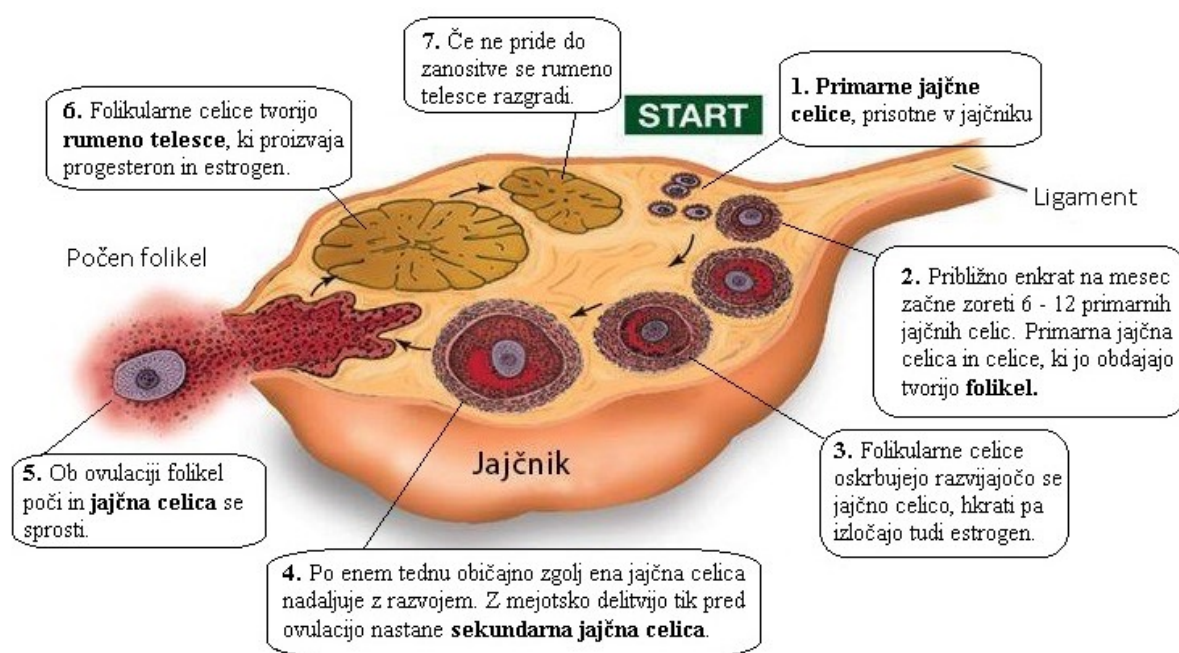
Ko se pri razvoju zarodka določi spol, se pri ženskem zarodku v zunanjem delu gonad razvijejo številni PF. Primarne jajčne celice oziroma PF se razvijejo že v prenatalnem obdobju, po rojstvu pa sledi njihova zoritev (Slika 2). V njih lahko ločimo vezivno ovojnico (lat. *theca*), ki nastane iz mezoderma ter dva tipa celic: jajčne celice, ki so nastale iz praspolnih celic (oogoniji) in foliklove epiteljske celice, ki so nastale iz epitelija na površini spolnih grebenov (Virant-Klun in sod., 2002).

Gamete nastanejo iz zarodnih celic, ki se razvijejo v obdobju zgodnjih celičnih delitev zarodka in ostanejo ločene, nato pa migrirajo v nastajajoče gonade, kjer iz njih pri ženskah začnejo nastajati oogoniji. Oogeneza poteka v ženskih gonadah – jajčnikih (Sadava in sod., 2006).

Jajčne celice torej nastanejo že v fetalnem obdobju življenja ženske (Virant-Klun, 2004). V petem mesecu nosečnosti ima ženski plod tako že približno 7 milijonov zarodnih celic, katerih razvoj se zaustavi v profazi prve mejotične delitve (profaza I), a v nadaljevanju nosečnosti propadejo v velikem številu. Tudi po rojstvu deklice število foliklov v jajčnikih eksponentno pada, dozoritev in ovulacijo dočaka samo približno 400 ženskih spolnih celic (Virant-Klun in sod., 2002). V začetnih fazah folikulogeneze parakrini faktorji spodbujajo rast jajčnih celic in bližnjih somatskih celic. Granulozne celice v primarnih foliklih postanejo kubične in se razmnožujejo ter tako tvorijo več plasti somatskih celic, ki obdajajo jajčne celice v sekundarnih foliklih. Ob odsotnosti gonadotropinov ti folikli postanejo atretični, propadejo in »izginejo« iz jajčnika (Soyal in sod., 2000). Proces propadanja ali atrezije lahko zajame folikel na katerikoli stopnji razvoja, začne se že v času znotrajmaterničnega razvoja deklice in konča v menopavzi. Približno pol milijona nastalih ženskih spolnih celic lahko prične propadati že v zgodnjem obdobju življenja, kar vodi v kasnejšo neplodnost, saj nove jajčne celice ne nastajajo več (Virant-Klun in sod., 2002).

Jajčne celice, ki ne propadejo, v nezrelem foliklu mirujejo do trenutka, ko prične posamezen folikel rasti, s tem pa začne rasti in zoreti tudi jajčna celica znotraj izbranega folikla (Virant-Klun, 2004). Ko se začnejo ob začetku zorenja jajčne celice deliti foliklove epiteljske celice, nastane večslojni folikularni epitelij, ki ga imenujemo tudi granulozni sklad (*stratum granulozum*), sestavljen iz granuloznih celic (Virant-Klun in

sod., 2002). Po približno enem tednu, je eden izmed foliklov večji od ostalih in ga imenujemo dominantni folikel; ta raste naprej, ostali pa se nehajo razvijati in se skrčijo. V večjem foliklu folikularne celice skrbijo za rast jajčne celice, jo oskrbujejo s hranili, rastnimi faktorji in hormonsko stimulacijo. Ob ovulaciji folikel razpade in jajčna celica se sprosti iz jajčnika (Sadava in sod., 2006). Celotno dogajanje skrbno nadzorujejo hormoni, ki delujejo na celice folikla in posredno na jajčno celico. Med samim razvojem je obstoj jajčne celice odvisen od ostalih celic folikla, zlasti granuloze (Virant-Klun, 2004).



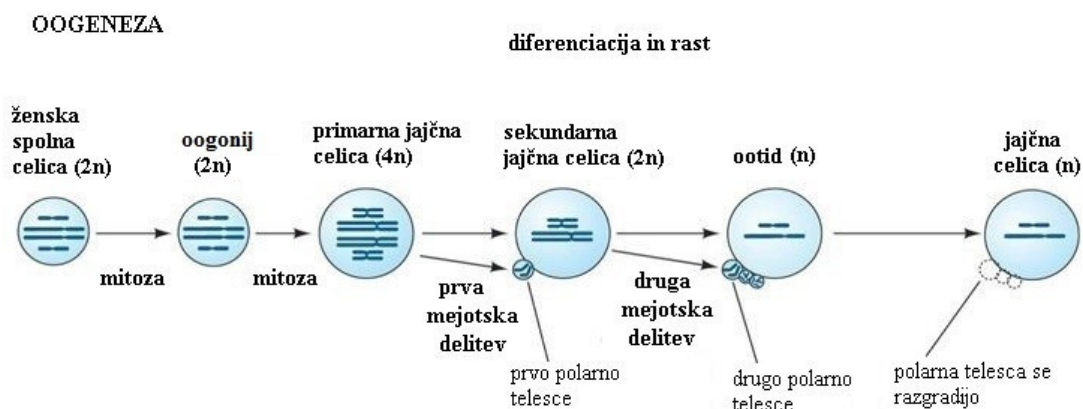
Slika 2: Zorenje jajčne celice v jajčnikovem ciklu. Jajčnikov cikel se začne z zorenjem jajčnikovega folikla in se zaključi z ovulacijo ter rastjo in propadom rumenega telesca (Sadava in sod., 2006).

Po ovulaciji se celice folikla še naprej delijo in oblikujejo maso endokrinega tkiva v velikosti frnikole. Ta struktura, imenujemo jo tudi rumeno telesce oz. *corpus luteum*, ostane v jajčniku in deluje kot endokrini žleza ter izloča estrogen in progesteron še približno 2 tedna. Če v tem času ne pride do oploditve in vgnezditve blastociste v endometrij, rumeno telesce propade (Sadava in sod., 2006).

2.1.2 Razvojna genetika jajčne celice

Oogoniji v jajčnikih so diploidni in se množijo z mitozo, sčasoma pa začnejo tvoriti primarne jajčne celice. Naslednji korak v gametogenezi (Slika 3) je profaza prve mejotične delitve (Sadava in sod., 2006). Mejoza je sestavljena iz dveh redukcijskih delitev: mejoze I in mejoze II. Mejoza, imenovana tudi redukcijska ali zoritvena delitev, je proces, ki omogoči nastanek haploidnih gamet, iz katerih se ob združitvi gamet ob

oploditvi, razvije diploiden organizem. Gre za kompleksen proces, ki zagotavlja, da število kromosomov iz generacije v generacijo ostaja konstantno, hkrati pa omogoča veliko pestrost genotipa in fenotipa, ki nastane zaradi mešanja materinega in očetovega dednega materiala (Virant-Klun in sod., 2002).



Slika 3: Oogeneza. Ženske spolne celice nastanejo z mitozo in mejozo. S prvo mejotsko delitvijo dobimo sekundarno jajčno celico s polarnim telescem. Z drugo mejotsko delitvijo ena hčerinska celica postane jajčna celica, ki ima eno do tri polarna telesca. Polarna telesca se nato razgradijo in dobimo eno zrelo jajčno celico (Sadava in sod., 2006).

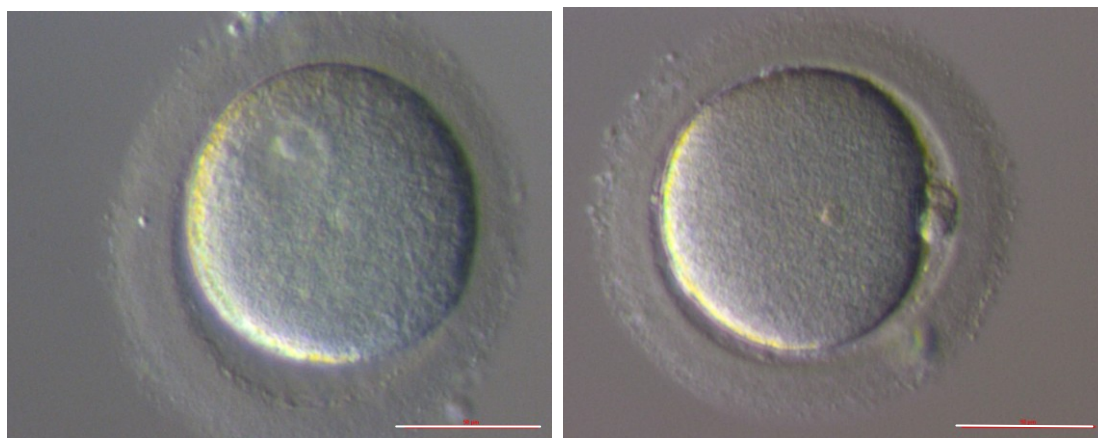
Mejotski delitvi primarne jajčne celice sta zelo neenakomerni, rezultat pa sta dve polarni telesci in haploidni ootid, ki se sčasoma diferencira v zrelo jajčno celico. Polarna telesca se razgradijo, torej je rezultat oogeneze ena zrelo jajčna celica za vsako primarno jajčno celico, ki je vstopila v mejozo. Razvoj jajčne celice se v fazi prve mejotične delitve zaustavi in miruje, pri ženskah ta doba traja vsaj 10 let (do pubertete). Tekom podaljšane profaze I, oziroma malo pred njenim zaključkom, začne primarna jajčna celica rasti – zoreti, s povečano produkcijo ribosomov, ribonukleinske kisline (RNA), citoplazemskih organelov in zaloga energije, da bo jajčna celica preživela prvo celično delitev po oploditvi. Nutrienti v jajčni celici morajo vzdrževati zarodek, da se lahko prehranjuje sam vse dokler se ne poveže z materinim obtokom (Sadava in sod., 2006). Vendar pa v zreli jajčni celici, ki je sposobna oploditve, mejoza še ni zaključena, temveč je zaustavljena v metafazi II mejotske delitve (MII) (Virant-Klun, 2004), to je sekundarna jajčna celica (Sadava in sod., 2006), ki zaključi mejozo šele po oploditvi jajčne celice s spermijem (Virant-Klun, 2004).

2.1.3 Jajčne celice, pridobljene za metode asistirane reprodukcije

Vzrokov za neplodnost je veliko, zato so se razvile številne tehnologije, ki omogočajo premostitev ovir za spočetje in/ali donositev otroka. Najpreprostejša metoda je intrauterina inseminacija, kjer zdravnik s posebnim katetrom vstavi seme v

reproduktivni trakt ženske. Novejše metode, imenovane MAR, pa vključujejo postopke pridobitve neoplojenih jajčnih celic iz jajčnika, njihovo interakcijo s spermiji izven telesa (IVF) in prenos enega ali največ dveh zarodkov v razvojni fazi manjceličnega zarodka, blastociste ali morule v maternico. Nadštevilne zarodke zamrznejo in shranijo v tekočem dušiku za kasnejši prenos v maternico oziroma implantacijo. Najbolj uspešna MAR je IVF, kjer ženska dobi hormonsko stimulacijo jajčnikov, ki povzroči zorenje večih jajčnih celic naenkrat (Sadava in sod., 2006). Pridobimo večinoma zrele jajčne celice, nekaj pa jih je tudi nezrelih in takih, ki so že v postopku propadanja in razgrajevanja (Virant-Klun, 2004).

Zrele jajčne celice (Slika 4, desno) lahko prepoznamo po t.i. polarnem telesu, ki je običajno okrogel mehurček na površini celice, gre pa za majhno in nefunkcionalno spolno celico. Nezrelo jajčno celico, ki je v profazi I (Slika 4, levo), prepoznamo po prehodnem jedru, germinalnem veziklu (GV); celico obdaja tanka plast celic granuloze, žarkasta korona pa se tesno prilega jajčni celici. Nezrele jajčne celice v metafazi I (MI) prve mejotske delitve prepoznamo po popolni okroglosti in odsotnosti polarnega telesa, jajčno celico obdaja malo celic granuloze, žarkasta korona se celici tesno prilega, celice kumulusa pa so kompaktne in brez celičnega matriksa (Virant-Klun, 2004).



Slika 4: Dve sveži jajčni celici. Nezrela (profaza I) jajčna celica z GV (levo) in zrele (MII) jajčna celica z lepo vidnim polarnim telesom in ZP, ki obdaja celotno celico (desno). Citoplazma je po celotni jajčni celici fino zrnata (invertni mikroskop). Merilo (bela črta): 50 μ m. (Laboratorij za oploditev z biomedicinsko pomočjo, Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana)

S posebnim postopkom lahko nezrele jajčne celice dozoriijo *in vitro*, z dodajanjem hormonov (predvsem folikel spodbujajoči hormon (FSH) in humani horionski gonadotropin (HCG)), celic granuloze in rastnih faktorjev in se kasneje uporabijo za metodo IVF (Virant-Klun, 2004).

Jajčne celice, ki jih pridobimo za IVF so lahko tudi morfološko nenormalne. Tu gre večinoma za nepravilne oblike jajčnih celic, velike vakuole v citoplazmi, poškodovano ZP, fragmentirano polarno telesce, izlivajočo se citoplazmo ter grobo zrnato ali

nehomogeno citoplazmo, najpogostejše pa so t.i. atretične jajčne celice v postopku programirane celične smrti oz. apoptoze (Virant-Klun, 2004).

Zunajtelesna oploditev (IVF) v kombinaciji z natančnimi metodami genetskih analiz zarodkov lahko izključi tveganje, da bi dva starša, ki sta nosilca genetske bolezni, imela prizadetega otroka. V celicah, ki jih z biopsijo odvzamejo iz blastociste, z molekularnimi analizami določijo morebitno nepravilnost genov (mutacije). Ta metoda se imenuje preimplantacijska genetska diagnostika in nam omogoča, da določimo, če je zarodek, ki je nastal z IVF, nosilec genetske napake ali ne. To omogoča, da pri paru, ki se sooča z genetskimi nepravilnostmi, v maternico prenesemo genetsko normalen zarodek in s tem preprečimo ponavljajoči se spontani splav ali rojstvo hudo prizadetega otroka (Sadava in sod., 2006).

2.1.4 Proteomika jajčne celice

Zoreče jajčne celice gredo skozi obsežno rast, ki jo spremlja visoka stopnja transkripcije, medtem ko so popolnoma zrele jajčne celice transkripcijsko utišane. Stroga translacijska kontrola teh transkriptov ima ključno vlogo za primerno časovno uravnan razvoj in zorenje jajčne celice, pomembna pa je vse do aktivacije genoma zigote oziroma zarodka, ki se razvije po oploditvi. Novejše raziskave so pokazale, da je translacija informacijske RNA (mRNA) jajčne celice ključna v zgodnjih fazah razvoja zarodka. Prav tako je translacija mRNA jajčne celice pod vplivom okoliških folikularnih (granuloznih) celic, vendar so tovrstni signali še slabo raziskani (Virant-Klun in sod., 2016).

Proteomske raziskave jajčnih celic sesalcev so precejšen izziv, saj za tovrstne raziskave potrebujemo veliko število celic. Človeške jajčne celice so tako do sedaj bile nedostopne za proteomske študije, saj so, v primerjavi z npr. jajčnimi celicami dvoživk (npr., žaba *Xenopus laevis*) majhne in nedostopne v velikem številu. Hkrati se ocenjuje, da je količina proteinov v človeški jajčni celici 100 ng, kar je zelo malo. Tako majhna količina začetnega materiala predstavlja ogromen izziv za proteomiko, saj za analize kompleksnih proteomov običajno potrebujemo do 5-krat toliko proteina v vzorcu. V kombiniranem naboru podatkov iz jajčnih celic, gojenih v normalnem IVF gojišču in »hanging drop« razmerah, so Virant-Klun in sodelavci prvič identificirali 2154 proteinov (prvi proteom humane jajčne celice), ki so jih nato uporabili za podrobnejše raziskave proteoma jajčne celice pri človeku. Proteom jajčne celice so primerjali s podatki o proteomih različnih celičnih tipov, da bi dobili vpogled v 1) biološke procese, ki ločijo jajčne celice od drugih celic in 2) posamezne proteine, ki so univerzalno ali vsaj preferenčno izraženi v jajčnih celicah. V naslednjem koraku jim je prvič uspelo analizirati tudi proteom posameznih jajčnih celic (Virant-Klun in sod., 2016).

V primerjalnih analizah so v jajčnih celicah našli 68 proteinov, vključenih v vezikularni transport, 135 proteinov ekstracelularnega matriksa in 48 celično adhezijskih proteinov, ki so v drugih celičnih linijah bili odsotni ali slabo izraženi, to pa kaže na dejstvo, da ima sekrecija in komunikacija z okoljem ključni pomen za jajčno celico. Prav tako so se v jajčnih celicah precej intenzivno izražale nekatere skupine proteinov, ki so povezani s celično obrambo in homeostazo, kar kaže na reaktivni celični fenotip in glavno funkcijo ohranjanja stabilnega stanja. Pogosti so bili tudi nekateri proteini povezani s transportom lipidov in metabolizmom. Dvaintrideset proteinov, pogostih v jajčnih celicah so Virant-Klun in sodelavci grupirali v razreda »spolno razmnoževanje« in »oploditev« (npr. ZP1 – ZP4, BMP15 in GDF9) (Virant-Klun in sod., 2016).

Proteini iz referenčnega proteoma, ki jih niso našli v jajčnih celicah, so predstavljali velike skupine proteinov, vključenih v procesiranje RNA, transkripcijo, *splicing*, biogenezo ribosomov, celični cikel in organizacijo kromatina. Prav tako ni bilo prisotnih molekularskih mehanizmov, ki so povezani s temi proteini. Te analize kažejo na to, da so jajčne celice velike, mirujoče celice s proteomom, prilagojenim za homeostazo, pritrditev celice in interakcije s sekretornimi faktorji (Virant-Klun in sod., 2016).

Podatki o proteomu humane jajčne celice so pokazali, da je sekrecija proteinov eden od najbolj zastopanih procesov v jajčnih celicah. V sekretomu 100 jajčnih celic so Virant-Klun in sodelavci identificirali 383 proteinov (prvi proteom sekretoma humanih jajčnih celic). Dvesto devetindevetdeset proteinov od teh so našli tako v proteomu kot sekretomu jajčne celice, medtem ko je bilo 39 proteinov značilnih samo za sekretom. Proteini sekretoma imajo številne funkcije, največjo skupino pa predstavljajo proteolitski proteini, ostali proteini sodelujejo pri celični homeostazi in nekaterih procesih povezanih z odgovorom in obrambo pred okoljem. Zanimiva proteina v sekretomu sta še WFDC2 (HE4) – majhen sekretorni protein, ki je impliciten v dozorevanju spermijev in je prekomerno izražen pri raku jajčnikov in GNDPA1 (OSCILLIN), ki je vključen v aktivacijo jajčne celice in zgodnji razvoj zarodka (Virant-Klun in sod., 2016).

Skupina dr. Virant-Klun in mednarodnih sodelavcev je raziskala tudi, če s poznanim proteomom jajčne celice lahko identificiramo razlike v izražanju proteinov med nezrelimi (GV faza) in zreliimi (MII faza) jajčnimi celicami. Primerjali so zastopanost posameznih proteinov v MII in GV jajčnih celic človeka. V GV jajčnih celicah sta bila močnejše zastopana dva proteina – Tdrkh in Caprin-2 (RNA-vezavni protein). Na drugi strani pa je bilo 18 proteinov, ki so bili v večji količini prisotni v MII jajčnih celicah (Wee2, PCNA-kritični regulator replikacije deoksiribonukleinske kisline (DNA), njegov koregulator DNMT1, koregulatorja CKAP5 in BUB1B ter TAC3, ki regulira strukturo delitvenega vretena in kontrolne točke v mitozu) (Virant-Klun in sod., 2016).

2.2 NEPLODNOST PRI ŽENSKAH

Pri ženski v rodnem obdobju je za zanositev in rojstvo otroka pomembno, da normalno delujejo vsi reproduktivni organi in organski sistemi, ki so udeleženi v tem procesu. Pomembni so hipotalamusni faktorji, zlasti gonadoliberin in dopamin, saj regulirajo sekrecijo hormonskih žlez za FSH, luteinizirajoči hormon (LH) in prolaktin, ki uravnavajo delovanje jajčnika. Pri delovanju jajčnika sodeluje tudi približno 30 rastnih faktorjev: inzulinu podobni rastni faktorji (IGF), proteini vezani na IGF, insulin, folistatin (FST), Müllerjeva inhibirajoča substanca. Na neplodnost pri ženski lahko vplivajo tudi nepravilnosti v oogenezi, ki so posledica patoloških in histoloških sprememb jajčnikov. Približno 7% ženske populacije ima t.i. sindrom policističnih jajčnikov (PCOS), ki ga spremljajo anovulatorni ciklusi in sklerotični jajčniki (Virant-Klun in sod., 2002).

Glavni vzroki za žensko neplodnost so organske napake in motnje, kot so neprehodni ali odstranjeni jajcevedi (odsotnost mesta oploditve), endometrioza (pojav maternične sluznice izven maternice – mehanske ali imunske prepreke za zanositev), nepravilno oblikovana ali pregrajena maternica (pogosto vzrok za spontane splave in prezgodnje porode), vnetje maternične sluznice (spremembe v sestavi sluznice onemogočijo ugnezditev jajčne celice), nepravilno delovanje jajčnika (PCOS, POF, bolezn genetskega izvora), imunski vzroki (npr. protitelesa proti spermijem, ki jim onemogočajo gibanje ali prodor skozi ZP), psihološki vzroki (posredno preko centralnega živčevja vplivajo na neuravnovešeno delovanje jajčnikov) in nezdrav način življenja (Virant-Klun in sod., 2002).

Velikokrat pa ima na človeka in njegovo reproduktivno zdravje vpliv tudi okolje. Vzrok za bolezn reproduktivnih organov je najverjetneje zgodnja izpostavljenost (predvsem v fetalnem obdobju) kemičnim snovem, ki povzročajo motnje endokrinega sistema, in drugim škodljivim snovem okolja. Med bolezn reproduktivnih organov tako štejemo vse težave pri oploditvi in zanositvi, prirojene nepravilnosti spolnih organov, slabšo kakovost spolnih celic, prezgodnjo puberteto pri deklicah in vse pogostejša rakava obolenja (rak na modih, rak jajčnikov, rak na prsih) (Virant-Klun in sod., 2002).

2.2.1 Učinki protirakavih terapij na reproduktivno sposobnost pacientk

Trenutni napredki v diagnosticiranju raka in novih oblik zdravljenj so izboljšali preživetje pacientov obolenih za rakom (Fabbri in sod., 2016), zlasti pri ženskah v njihovem reproduktivnem obdobju (Nurudeen in sod., 2016). Zdravljenje z visokimi odmerki kemoterapevtikov in/ali radioterapije pri mladih pacientkah, obolenimi za rakom ima lahko škodljive učinke na jajčnike in folikularni »pool«, kar vodi v POF in neplodnost (Herraiz in sod., 2014). Tovrstne pacientke imajo tudi večjo verjetnost za stromalno fibrozo, hkrati pa ima zgodnja menopavza negativne učinke tudi na kvaliteto

življenja, saj je lahko povezana z osteoporozo, srčno-žilnimi boleznimi in psihosocialnimi motnjami kot je npr. depresija (De Vos in sod., 2014).

Posledice alkilirajočih agensov so odvisne od starosti pacientke, z večjim vplivom v višji starosti, so pa več ali manj vsi toksični za jajčnike (Levine in sod., 2010). Nedavne študije učinkov alkilirajočega ciklofosfamida pri miših so pokazale, da ciklofosfamid povzroči apoptozo večjih rastočih foliklov in inducira aktivacijo PF, kar vodi v izgorelost foliklov. Druga kemoterapevtska zdravila lahko neposredno poškodujejo rastoče jajčne celice ali močno proliferativne granulozne celice znotraj razvijajočih se foliklov. Zdravila lahko povzročijo tudi posreden propad foliklov, ko poškodujejo rastoče folikle in spremenijo delovanje PF, lahko pa spremenijo stromo jajčnikov (De Vos in sod., 2014).

Obsevanje medeničnega predela ima lahko močnejše učinke na jajčnike, medtem ko obsevanje celotnega telesa v primeru hematoloških malignosti vpliva na volumen maternice, kar pa se vsaj delno lahko popravi s hormonsko terapijo. Obsevanje glave večje od 40 Gy, zmanjša delovanje hipotalamične hipofize in povzroči hipogonadizem (manjše izločanje hipotalamičnega sproščevalnega hormona gonadotropinov (GnRH)) (Levine in sod., 2010).

2.2.2 Metode ohranjanja plodnosti pri ženskah

Uveljavljene metode ohranjanja plodnosti so krioprezervacija zarodkov in jajčnih celic in transpozicija jajčnika, ki se lahko ponudi ženskam, ki so podvržene obsevanju medenice (De Vos in sod., 2014).

Krioprezervacija zarodkov je trenutno najbolj uveljavljen in pogost način za ohranjanje plodnosti (Nurudeen in sod., 2016). Pri krioprezervaciji jajčnih celic ali zarodkov je potrebna hormonska hiperstimulacija jajčnikov (COH), začetek katere uskladijo s fazami menstrualnega ciklusa in je povezana z znatnim povečanjem koncentracije krožečega estradiola. Številni onkologi zato oklevajo pri odobritvah COH za krioprezervacijo jajčnih celic in zarodkov, zlasti pri pacientkah, ki trpijo za rakom, ki se odziva na hormonsko stanje v telesu. Krioprezervacija zarodkov zahteva prisotnost partnerja ali uporabo semena donorja, kar je lahko etično in pravno sporno v primeru usode zarodkov, če pacientka umre ali se s partnerjem razideta (De Vos in sod., 2014). Novejše izboljšave postopkov počasnega zamrzovanja in vitrifikacije pa predstavljajo krioprezervacijo jajčnih celic tudi kot vse boljšo možnost, zlasti za ženske, ki nimajo partnerja ali imajo etične zadržke glede razpolaganja z zarodkom (Nurudeen in sod., 2016).

Zunajtelesna oploditev (IVF), ki vključuje hormonsko spodbujanje jajčnikov, pridobivanje jajčnih celic, oploditev in nato transfer zarodka (svežega ali odmrznjenega)

v maternico, je temeljito ovrednotena in zelo uspešna metoda za zdravljenje neplodnosti pri ženskah mlajših od 40 let. Za krioprezervacijo jajčnih celic ali zarodkov oz. hormonsko spodbujanje jajčnikov je potrebno 10 do 14 dni za razvoj foliklov, kar onemogoči uporabo te metode pri mladih ženskah, ki morajo začeti s protirakavo terapijo nemudoma in nimajo časa za hormonsko spodbujanje jajčnikov. Pri teh pacientkah se običajno izvede biopsijo skorje jajčnika, tkivo jajčnika pa se zamrzne za kasnejšo avtotransplantacijo. Vzporedno s tem je možno iz tkiva jajčnika pridobiti nezrele jajčne celice, jih dozoreti *in vitro* in vitrificirati za kasnejšo uporabo (Levine in sod., 2010).

Majhna količina podatkov o krioprezervaciji zarodkov in jajčnih celic otežuje svetovanje in vključevanje teh terapij za ohranjanje plodnosti v oskrbo onkoloških pacientov (Nurudeen in sod., 2016). Razkritje mehanizmov aktivacije in supresije rasti foliklov ne bo le razširilo oskrbe tisočih žensk, ki so jim diagnosticirali raka, ampak tudi povečalo informiranje o oskrbi milijonov žensk, ki se soočajo z manjšim reprodukcijskim potencialom zaradi staranja (De Vos in sod., 2014).

Potencial kaže tudi krioprezervacija in transplantacija tkiva jajčnika (Levine in sod., 2010). Povprečno endokrino delovanje jajčnika po transplantaciji je 5 let, s čimer se ta metoda pokaže tudi kot možnost za zakasnitev menopavze (De Vos in sod., 2014). Presaditev tkiva jajčnika po izrezovanju in zamrznitvi je inovativna in obetavna možnost, prednost metode pa je takojšnja možnost postopka, kar zmanjša odlašanje s kemoterapijo in je potencialni vir številnih foliklov ter jajčnih celic za plodnost v prihodnosti (Levine in sod., 2010).

Z zbiranjem nezrelih jajčnih celic iz majhnih antralnih foliklov, z omejeno stimulacijo ali brez nje, in sledečo IVM (Levine in sod., 2010) se izognemo potrebi po stimulaciji jajčnikov z uporabo gonadotropinov pred zbiranjem jajčnih celic, kar bistveno skrajša odlog kemoterapije. Ta metoda ponuja možnosti ženskam, ki morajo pričeti s kemoterapijami kmalu po postavitvi diagnoze in dekletom pred puberteto, ki ne morejo skozi postopek stimulacije jajčnika (De Vos in sod., 2014). *In vitro* zorenje (IVM) nezrelih jajčnih celic pred oploditvijo je bilo uporabljeno že v nekaterih centrih pri ženskah z normalnimi ali policističnimi jajčniki. Kljub obetavnim rezultatom pa je število vgnezditev in nosečnosti bistveno nižje kot pri IVF z zreliimi jajčnimi celicami (Levine in sod., 2010).

Kirurška transpozicija jajčnikov izven območja medeničnega obsevanja se je izkazala kot metoda, ki zmanjša poškodbe jajčnikov zaradi protirakave terapije. Pri ženskah analogi GnRH inducirajo začasno in povratno medicinsko stanje hipoestrogenizma z zmanjšanim proizvodnjem FSH hormona hipofize in LH. Analogi GnRH so lahko GnRH agonisti, ki zmanjšajo transkripcijo receptorjev ali GnRH antagonisti, ki delujejo po načelu kompetitivne inhibicije. V živalskih modelih so se GnRH analogi izkazali kot

zaščita jajčnika pred poškodbami zaradi kemoterapije, vendar pa sami mehanizmi te zaščite niso dobro poznani (Levine in sod., 2010).

Razvijajo se tudi strategije za gojenje foliklov *ex vivo*, ki služijo pri raziskavah razvoja foliklov, kažejo pa se možnosti tudi pri ohranjanju plodnosti. Glavna prednost tovrstnega sistema je to, da celotna rast foliklov poteka *in vitro*, s čimer dobimo zrele jajčne celice, ki jih lahko oplodimo. Vendar pa ta metoda ne obnovi endokrine funkcije jajčnika, zato pacientke potrebujejo doživljenjsko upravljanje hormonskega delovanja jajčnikov (De Vos in sod., 2014).

Zanimanje za ohranjanje plodnosti je vedno večje (De Vos in sod., 2014) in s primernim svetovanjem ter multidisciplinarno nego imajo namreč novo-diagnosticirane onkološke pacientke z ohranjanjem plodnosti podobne možnosti in uspešnost zanositve kot zdrave ženske njihove starosti (Nurudeen in sod., 2016). A številni pacienti z rakom ter delavci v zdravstveni negi niso seznanjeni s hitrim razvojem v raziskavah ohranjanja plodnosti in njihovim izvajanjem v klinični praksi (De Vos in sod., 2014). Prepreke, ki zmanjšujejo uporabo terapij za ohranjanje plodnosti pri rakavih bolnikih so še: zaskrbljenost zaradi morebitnih zamud pri protirakavih terapijah zaradi terapij za ohranjanje plodnosti, precenitev stroškov povezanih z ohranjanjem plodnosti in pomanjkanje časa za razpravljanje o tem vprašanju (Levine in sod., 2010).

2.3 TRANSKRIPCijski FAKTOR FIGLA

Transkripcijski faktorji (TF) naj bi nadzirali trajanje reproduktivnega obdobja, uspešnost oploditve, zgodnji razvoj zarodka in tvorbo tumorjev na jajčnikih. Ključno vlogo v zgodnji folikulogenezi imata dva TF specifična za jajčno celico – FIGLA in NOBOX. Faktor FIGLA je klasični helix-loop-helix (angl. *basic helix-loop-helix* – bHLH) TF (Pangas in Rajkovic, 2006), specifičen za spolne celice, za katerega se je izkazalo, da vpliva na formiranje PF. Tekom postnatalnega razvoja jajčnika FIGLA aktivira ženski fenotip in zavira gene za moške spolne celice. Izražanje FIGLA so odkrili v ovarijskih foliklih in jajčnih celicah v MII, kar kaže na to, da je lahko pomemben za regulacijo genov povezanih z oogenezo, dokler jajčna celica ne dozori (Tosh in sod., 2014).

2.3.1 Karakterizacija gena za transkripcijski faktor FIGLA

Protein FIGLA je TF, ki regulira ekspresijo proteinov ZP – ZP1, ZP2 in ZP3 in je bistven za folikulogenezo pri miših. S poznano *FIGLA* sekvenco pri miših so našli visoko pokrivnost sekvence s človeškim kromosomom 2 BAC. Mišja *FIGLA* sekvenca (MMU91840) je pokazala nekatere homologije s človeškim BAC klonom RP11-50401 na kromosomu 2. Človeški homolog gena za *FIGLA* se nahaja na kromosomu 2p12,

potrebne pa so še številne študije njegove vloge v normalnem razvoju jajčne celice pri človeku in morebitni vpletenosti v plodnost ljudi (Huntriss in sod., 2002).

Z uporabo metode SMART sinteze komplementarne DNA (cDNA) so Huntriss in sodelavci iz različnih faz človeških ovarijskih foliklov, zrelih jajčnih celic in predimplantacijskih zarodkov, oblikovali ekspresijski profil transkripta, ki je bil domnevni homolog človeškega gena *FIGLA* (Slika 5). Na podlagi računalniških predpostavk celotne *FIGLA* sekvence in dobljenih amplikonov iz vzorcev so sestavili sekvenco človeškega gena *FIGLA*. Analize predvidene ekson/intron sestave človeškega gena *FIGLA* so pokazale 4 eksone na kromosomu 2p12, ki kodirajo protein iz 186 aminokislin (AK) (Huntriss in sod., 2002). Kasnejše raziskave Bayne-a in sodelavcev so potrdile lokacijo gena na kromosomu 2p12, struktura gena *FIGLA* pa se je nekoliko razlikovala od te, ki so jo z računalniškimi analizami določili Huntriss in sodelavci (2002) (Bayne in sod., 2004). Tudi Bayne in sodelavci so za iskanje človeškega homologa uporabili sekvenco mišjega gena *FIGLA*. Iz vzorcev jajčnika človeških zarodkov, starosti 14 – 19 tednov, so pridobili nov produkt predvidene velikosti (300 baznih parov (bp)). Pri novo oblikovani sekvenci gena je 5' konec ustrezal predhodno določeni kodirajoči sekvenci (Huntriss in sod., 2002), proti 3' koncu pa so našli nekatera odstopanja. Na podlagi tega naj bi bil gen *FIGLA* sestavljen iz petih, ne štirih eksonov. Eksona 1 in 2 ostajata enaka kot so ju objavili Huntriss in sodelavci, prav tako sekvence predstavljene v eksonu 3, ki je podaljšan za 71 bp navzdol, na račun alternativnega mesta rezanja. Med eksonom 3 in prej predvidenim eksonom 4, so odkrili popolnoma nov ekson. Ekson 5 pa je načeloma enak predhodno določenemu eksonu 4, le da dodajanje eksonskih sekvenc navzgor spremeni bralni okvir tako, da je uporabljen alternativni STOP kodon 10 bp navzgor od prej določenega (Bayne in sod., 2004).

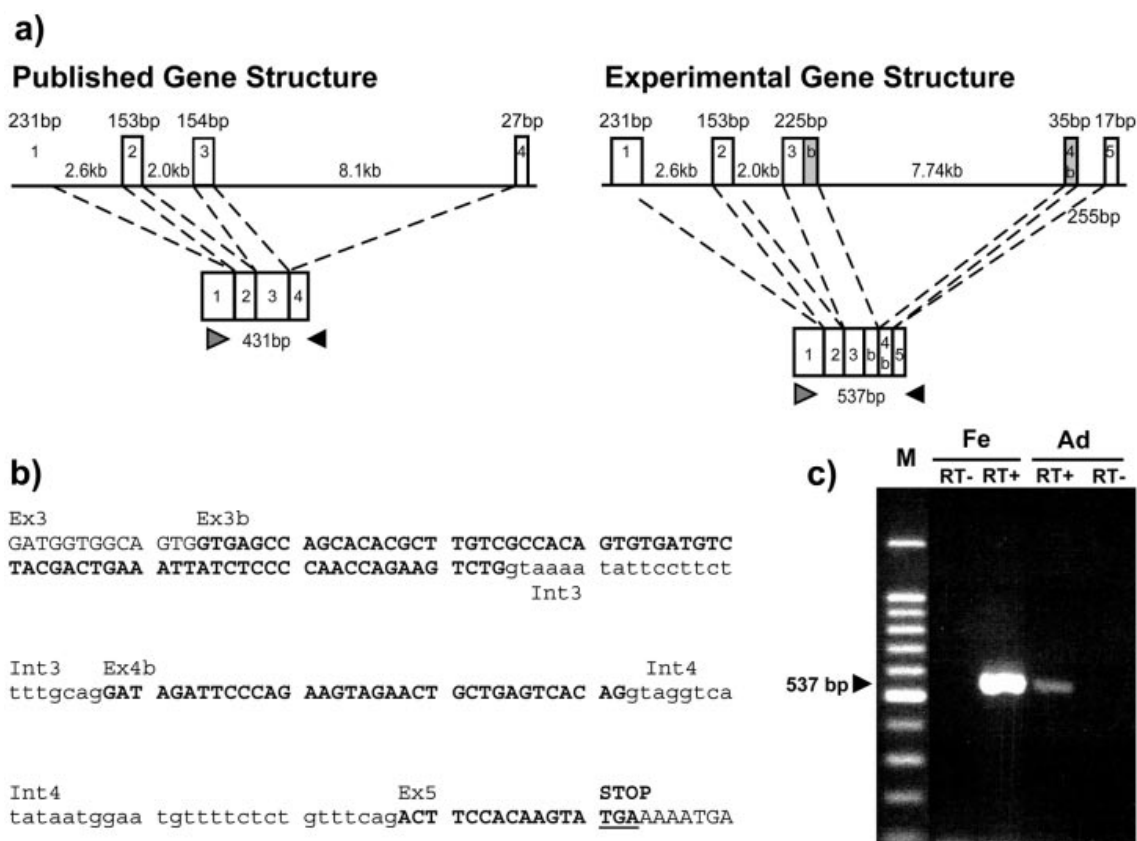
```

1
ctgcc
Met Asp Pro Ala Pro Gly Val Leu Asp Pro Arg Ala Ala Pro Pro Ala Leu 17
6 ATG GAC CCC GCG CCC GGC GTC CTA GAT CCC CGC GCC GCG CCG CCC GCG CTC
Leu Gly Thr Pro Gln Ala Glu Val Leu Glu Asp Val Leu Arg Glu Gln Phe 34
57 CTG GGC ACC CCG CAA GCC GAG GTG CTG GAG GAC GTG TTG CCG GAG CAG TTC
Gly Pro Leu Pro Gln Leu Ala Ala Val Cys Arg Leu Lys Arg Leu Pro Ser 51
108 GGG CCG CTG CCC CAG CTG GCC GCT GTC TGC CGG CTC AAG CCG CTG CCC TCG
Gly Gly Tyr Ser Ser Thr Glu Asn Leu Gln Leu Val Leu Glu Arg Arg Arg 68
159 GGC GGC TAC TCG TCC ACT GAA AAC CTC CAG TTG GTG CTG GAG CCG CCG CGT
Val Ala Asn Ala Lys Glu Arg Glu Arg Ile Lys Asn Leu Asn Arg Gly Phe 85
210 GTG GCC AAC GCC AAG GAG CGT GAG CGG ATA AAA AAT CTC AAC CGT GGT TTT
Ala Arg Leu Lys Ala Leu Val Pro Phe Leu Pro Gln Ser Arg Lys Pro Ser 102
261 GCC AGA TTG AAG GCA CTT GTG CCA TTT CTT CCC CAA AGC AGG AAG CCC AGC
Lys Val Asp Ile Leu Lys Gly Ala Thr Glu Tyr Ile Gln Val Leu Ser Asp 119
312 AAA GTT GAT ATC CTT AAA GGT GCG ACT GAA TAT ATA CAG GTT CTC AGT GAT
Leu Leu Glu Gly Ala Lys Asp Ser Lys Lys Gln Asp Pro Asp Glu Gln Ser 136
363 CTT TTG GAA GGA GCC AAA GAC TCA AAG AAA CAA GAC CCA GAT GAG CAG AGC
Tyr Ser Asn Asn Thr Ser Glu Ser His Thr Ser Ser Ala Arg Gln Leu Ser 153
414 TAT AGT AAC AAC ACT TCT GAA TCA CAT ACA TCC TCG GCA AGA CAG CTG TCA
Arg Asn Ile Thr Gln His Ile Ser Cys Ala Phe Gly Leu Lys Asn Glu Glu 170
465 AGA AAC ATC ACC CAA CAT ATC AGC TGT GCT TTC GGC TTG AAG AAT GAA GAG
Glu Gly Pro Trp Ala Asp Gly Gly Ser Gly Glu Pro Ala His Ala Cys Arg 187
516 GAA GGG CCT TGG GCA GAT GGT GGC AGT GGT GAG CCA GCA CAT GCT TGT CGC
His Ser Val Met Ser Thr Thr Glu Ile Ile Ser Pro Thr Arg Ser Leu Asp 204
567 CAC AGT GTG ATG TCT ACG ACT GAA ATT ATC TCC CCA ACC AGA AGT CTG GAT
Arg Phe Pro Glu Val Glu Leu Leu Ser His Arg Leu Pro Gln Val Stop 219
618 AGA TTC CCA GAA GTA GAA CTG CTG AGT CAC AGA CTT CCA CAA GTA TGA aaa
669 aaggaaagccagggttaccttctagagacaaataaatgcagtccttgaaggttaa

```

Slika 5: DNA in predvideno zaporedje AK pri človeški *FIGLA* cDNA, pridobljeni eksperimentalno. Kodirajoče regije so napisane z velikimi tiskanimi črkami, neprevedene regije pa z malimi tiskanimi črkami. Meje eksona so označene znotraj črnih navpičnih linij, predhodno določene meje med eksonoma 3 in 4 pa so označene s prekinjeno navpično črto. Dodatna eksonska sekvenca je v odebeljenem tisku. Močno ohranjene regije so označene s poševnimi črtami preko zaporedja (*/*), HLH motiv pa s sivim obarvanjem in poševno oznako (*/*) (Bayne in sod., 2004).

Predvidena velikost produkta, ki temelji na novi sekvenci *FIGLA*, je 537 bp (Slika 6, b), medtem ko je bila velikost produkta določenega na podlagi podatkovne baze 431 bp (slika 6, a). Tako iz jajčnikov in zarodkov kot jajčnih celic odraslih so izolirali le produkt velik 537 bp (slika 6, c), kar nakazuje na to, da je nova kodirajoča sekvenca *FIGLA* edini transkript (Bayne in sod., 2004).



Slika 6: (a) Genomska struktura zaporedja gena *FIGLA* pri človeku. Prikazani sta prej objavljena in trenutna eksperimentalna intron/ekson struktura, s pričakovanimi produkti. (b) Meje med eksoni in introni na novem zaporedju eksonov. Zaporedja eksonov so v velikih tiskanih črkah, zaporedja intronov pa v malih tiskanih črkah. Novo zaporedje eksona je v odebeljenem tisku. Nov STOP kodon je podčrtan. (c) Potrditev *FIGLA* mRNA strukture. S primerji F2/R1 so dobili produkt iz 537 bp iz vzorcev zarodnih (fetal – Fe) in odraslih (adult – Ad) RT+ cDNA jajčnikov, ne pa iz RT± kontrol (linija 1 and 4). Markerji (M) so 100 bp dolga zaporedja (Promega, UK) (Bayne in sod., 2004).

Human	MDPAPGVLDPRAAPPALLGTPQAEVLEDVLRQFGP--LPQLAAVCRLKRLPSGGYSSTE	58
Mouse	MDT-----APASPEPFLVTPQAEVLEELIQQMGP--LPRLAAICRLKRLPSGGYSTTD	52
Rat	MDTS-----SPASPEPFLATPQAEVLEELLQTLGP--LPRLAAICRLKRLPSGGYSTTD	53
Medaka	-----MKVPEAELMSDILKRLTGESALPLYCCIEKYKRERNGLYFVAE	43
Human	NLQVLVLEERRRVANAKERERIKNLNRGFARLKALVPFLPQSRKPSKVDILKGATEYIQVLS	118
Mouse	DLHLVLVLEERRRVANAKERERIKNLNRGFAKLKALVPFLPQSRKPSKVDILKGATEYIQILG	112
Rat	DLHLVLVLEERRRVANAKERERIKNLNRGFAKLKALVPFLPQSRKPSKVDILKGATEYIRILG	113
Medaka	DFTETVKKREMVNAKERLRIRNLNTMFSRLKRMLPLMQPDKKPSKVDTLKAATEYIRLLL	103
	<div style="display: flex; justify-content: center; gap: 100px;"> <div style="text-align: center;"> <p>basic</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>helix-loop-helix</p> </div> </div>	
Human	DLLEGAKDSKKQDPDEQ-SYSNNTSESHTSSARQLSRNITQHISCAFGLKNEEEGPWADG	177
Mouse	CVLEEAKVSEKQSPPEEQ-THSGRPSDPHVSSTRELLGNATOPTSCASGLKKEEEGPWAYA	171
Rat	CVLEGAKASEKQGPEEQQVHSSRPSDPHVSSTRELLGNATOPTGCASGLKKEEEGPWAYG	173
Medaka	AVLRDTENNNTGTDFLKNAITYGQQDGFANDLWRMDDFLNLSDDHDMEDGFTMPAEPAAED	163
	*	
Human	GSGEPAHACRHSVMSTTEIISPTRSLDRFPEVELLSHRLPQV	219
Mouse	GHSEPLYSYHQSTVP-----ETRSY-----FTH-----	194
Rat	GHSE-LYSYHQSAVP-----ETRSY-----FIH-----	195
Medaka	GDMT-RLVLQHCVMP-----AYQFI IQVAPDQASRD----	193

Slika 7: Primerjava zaporedja proteina FIGLA pri človeku, miših, podganah in ribi medaki. Aminokislinski ostanki, ohranjeni pri vseh vrstah so označeni s sivo. Regiji »basic« in HLH, ki sta močno ohranjeni pri obeh vrstah sta označeni s podpisom, z * pa je označeno ohranjeno TRS fosforilacijsko območje (Bayne in sod., 2004).

Nova sekvenca predvideva protein dolžine 219 AK, pri večih vrstah (človek, miš, podgana, medaka) je ohranitev zaporedja bHLH domene izredno visoka (slika 7) (Bayne in sod., 2004).

2.3.2 Mesta izražanja gena *FIGLA*

Soyal in sodelavci so pri miših v začetnih fazah ekspresije (gestacijska starost zarodka – 15. embrionalni dan – ED15) gena *FIGLA* odkrili, da so bili transkripti omejeni na citoplazmo celice, pri ED17 pa so jih našli izključno v jajčnih celicah v jajčniku. Z natančnejšimi analizami so dokazali, da v neonatalnih jajčnikih pri homozigotnih *FIGLA* null miših, ni prisoten noben od ZP transkriptov, ki se v normalnih okoliščinah sicer izražajo (Soyal in sod., 2000).

Huntriss in sodelavci so ekspresijo *FIGLA* opazovali pri miših in ljudeh. Protein so zaznali v mišjih ovarijskih foliklih in MII jajčnih celicah, kar kaže na to, da je *FIGLA* verjetno pomembna pri regulaciji genov povezanih z oogenezo, dokler jajčna celica ne doseže stopnje zrelosti. Pri miših je bila ekspresija gena *FIGLA* v odraslih tkivih jajčnika komaj zaznavna, vrh pa ekspresija doseže okrog drugega dne po skotitvi. Ekspresija mišjega gena *FIGLA* je prisotna tudi v testisih, vendar pa so *FIGLA* null samci normalno plodni. Ti rezultati in rezultati o manjši ekspresiji človeškega gena *FIGLA* v testisih, nakazujejo na dejstvo, da protein *FIGLA* ni ključen za moško

reprodukcijsko funkcijo, zato lahko rečemo, da je gen *FIGLA* značilen za žensko zarodno linijo (Huntriss in sod., 2002).

Da bi lahko potrdili, da je protein FIGLA specifičen za ženske zarodne celice, so Huntriss in sodelavci izvedli tudi analize številnih človeških tkiv. Za kontrolo so uporabili cDNA PF. V vzorcih tkiv, razen v kontrolnem vzorcu PF, niso zaznali človeške FIGLA, zato lahko sklepamo, da so transkripti človeškega gena *FIGLA* redko/nepripravljeni v odraslih jajčnikih ali drugih tkivih. Ker lahko cDNA iz ovarijskih foliklov vsebuje tudi mRNA jajčnih celic in granuloznih celic, so analizirali še vzorce granuloznih celic izoliranih iz antralnih foliklov, vendar v teh vzorcih PCR analize niso pokazale *FIGLA* transkriptov (Huntriss in sod., 2002).

Bayne in sodelavci pa so ekspresijo gena *FIGLA* pri človeku našli tudi v posameznih jajčnih celicah v fazi GV pri odraslih ljudeh. Pregledali so vzorce številnih tkiv in zarodkov, vendar so ekspresijo gena *FIGLA* zaznali le v jajčniku. Dokazali so, da je izražanje gena *FIGLA* omejeno na jajčnike, kjer se izraža tako med razvojem zarodka kot v jajčnih celicah v odraslem obdobju. Primerjava nove proteinske sekvence gena *FIGLA* s homolognim genom pri miših, podganah in medaki pa je pokazala visok nivo ohranjanja v bHLH domeni pri vseh vrstah. Rezultati raziskave tako potrjujejo vlogo gena *FIGLA* za preživetje jajčnih celic v PF, kar so dokazale tudi raziskave na glodalcih (Bayne in sod., 2004).

2.3.3 Transkripcijski faktor FIGLA in folikulogeneza

V sesalcih jajčnikih se PF tvorijo perinatalno in predstavljajo življenjsko zalogo spolnih celic (Soyal in sod., 2000). Večina znanja o strukturi in funkciji PF temelji na študijah, ki so jih izvedli na miših (Tosh in sod., 2014). Študije folikulogeneze mišjih ovarijev so pokazale, da bHLH TF igra izredno pomembno vlogo pri formaciji PF. Ciljna mutagenaza na genu *FIGLA*, ki kodira TF FIGLA ima za posledico jajčnike z manjšo vsebnostjo spolnih celic (Huntriss in sod., 2002); takoj po rojstvu propadejo vsi morebitni PF (Tosh in sod., 2014) in homozigotne samice brez gena *FIGLA* (*FIGLA* null) so posledično sterilne (Huntriss in sod., 2002). Samci *FIGLA* null so bili normalno plodni (Soyal in sod., 2000). Pri miših FIGLA sodeluje tudi pri regulaciji koordinirane ekspresije genov, ki kodirajo glikoproteine ZP (ZP1, ZP2 in ZP3) (Huntriss in sod., 2002). Pri homozigotnih *FIGLA* null samicah ni ekspresije ZP1, ZP2 in ZP3 genov (Tosh in sod., 2014), kar kaže na ključno regulatorno vlogo FIGLA pri ekspresiji številnih za jajčne celice specifičnih genov. To vključuje tudi začetno folikulogenezo in gene, ki kodirajo ZP, ki je pomembna za oploditev in zgodnje preživetje zarodka (Soyal in sod., 2000).

Protein FIGLA je torej pomemben regulacijski faktor pri folikulogenezi, hkrati pa igra vlogo modulatorja pri ostalih »downstream« genih, ki so ključni pri zgodnji

folikulogenezi (Tosh in sod., 2014). Razvoj in rast jajčnih celic sesalcev zahteva koordiniran program genskega izražanja, katerega rezultat je razvoj foliklov. Jajčna celica sesalcev sama regulira razvoj jajčnih foliklov, predvidevajo pa, da so geni, ki se izrazijo v zgodnejših fazah in specifično med rastjo in razvojem jajčne celice, najverjetneje prisotni pri ključnih stopnjah tega razvoja. Odkriti so bili že številni rastni faktorji, ki sodelujejo pri folikulogenezi (*growth differentiation factor* (GDF-9), *bone morphogenetic protein* (BMP-15), KIT receptor, OCT4 TF, AMH) (Huntriss in sod., 2002). Rezultati so pokazali prisotnost tako rastnih faktorjev, kot površinskih proteinov v *FIGLA* null mišjih jajčnikih, kar kaže na to, da nesposobnost tvorbe PF ni odvisna od odsotnosti transkriptov, ki kodirajo te proteine (Soyal in sod., 2000). Čeprav so prisotne razlike v časovni regulaciji formiranja »pool-ov« PF med ljudmi, podganami, ovcami in mišmi, pa je sam proces in njegova regulacija med vrstami podobna. Transkriptomске študije pri ovcah, miših, podganah, nečloveških primatih in odraslih ljudeh so pokazale, da obstajajo geni, ki imajo verjetno vlogo pri oblikovanju PF: *Dazl*, *Figla*, *Nobox*, *Sohlh1*, *Gdf9*, *Zp2*, *Zar1* in *Nalp5* (Fowler in sod., 2009).

Človeški gen *FIGLA* s TF E12 (TCF3) tvori dimer, ki se veže v E-box ZP2 promotorja, ki igra vodilno vlogo pri preživetju jajčnih celic v stopnji PF v razvijajočem jajčniku ženske (Tosh in sod., 2014).

Možni mehanizmi, ki povzročajo POF, vključujejo začetni upad »pool-a« PF ali nepravilnosti v zorenju PF, ki so ključni pri določanju dolžine plodnega obdobja žensk. Povečano ekspresijo TF *FIGLA* so opazili v jajčnikih človeškega zarodka med formiranjem PF. Transkripcijski faktor (TF) *FIGLA* igra ključno vlogo kot regulator genov, specifičnih za jajčne celice v folikulogenezi, pri oploditvi in zgodnjem razvoju zarodka (Tosh in sod., 2014).

2.3.4 Posledice mutacij gena za transkripcijski faktor FIGLA

Formiranje PF predstavlja najpomembnejši samostojni dogodek pri vzpostavljanju maksimalnega potenciala plodnosti pri odraslih ženskah in je ključni razvojni proces, ki določa ali bo ženska podvržena POF in zgodnji menopavzi (Fowler in sod., 2009). Jajčnikov folikel z jajčno celico se pri ljudeh oblikuje tekom drugega trimesečja nosečnosti. Za razumevanje regulacije formiranja foliklov in za raziskovanje stanj, v katerih je formiranje foliklov abnormalno ali v katerih pride do POF, je potrebna identifikacija genov, ki nadzorujejo to razvojno fazo. Formiranje PF vključuje tudi interakcije med jajčnimi celicami in somatskimi pre-granuloznimi celicami. Za tovrstne interakcije in preživetje celice v različnih fazah razvoja so pomembni številni faktorji in eden izmed kandidatov je tudi človeški homolog gena *FIGLA* (Bayne in sod., 2004).

Tosh in sodelavci so v izbrani populaciji našli 7 variant mutacij gena *FIGLA*, ki lahko vplivajo na razvoj POF:

Znotraj eksona 2 so odkrili varianto c.239A→T, ki ni imela vpliva na zaporedje AK in je bila prisotna tako pri ženskah s POF kot v skupini zdravih žensk.

Znotraj introna 4 so odkrili novo mutacijo (c.649 + 8A→G), ki so jo našli pri zgolj dveh ženskah s POF in pri nobeni iz kontrolne skupine. V tem primeru gre za prvo poročanje o tovrstni varianti mutacije na tej lokaciji gena *FIGLA*.

Dve mutaciji so našli v 3'UTR regiji, vendar ni bilo statistično pomembnih razlik med skupinama, zato se predvideva, da ni povezave med tema variantama in motnjo.

Pri nesinonimni mutaciji c.252C→T na eksonu 2 pri osebah s POF, se osnovna oblika (wt) AK in nova AK razlikujeta v velikosti. Mutirani ostanek je manjši, kar lahko vodi v izgubo interakcij. Mutacija doprinese k večji hidrofobnosti ostankov na tej poziciji, saj povzroči konzervativno spremembo iz polarne AK v manj polarno AK, kar lahko vodi v izgubo vodikovih vezi in/ali moti pravilno zvijanje proteina. Ta varianta se je izkazala kot edina, ki potencialno vpliva na normalno rezanje. Predvidevajo, da pride do dodatka novega mesta rezanja v eksonu 2, kar spremeni normalno zaporedje proteina. Ta varianta ni bila prisotna v kontrolni skupini in se je izkazala za nevarno, saj se nahaja znotraj funkcionalne domene gena *FIGLA*. Proteini bHLH so močno ohranjeni znotraj vrst in vezava bHLH regije *FIGLA* s TCF3, je pomembna za aktivacijo ekspresije gena ZP, ki je ključen za formiranje PF in preživetje jajčnih celic.

Sinonimna varianta c.557C→T iz eksona 3, ki je bila pogostejša pri kontrolni skupini, ne povzroči nobenih sprememb v zaporedju AK, izkazalo pa se je, da je v kombinaciji z varianto c.427G→C, zelo visok faktor tveganja za ženske s POF.

Nesinonimno mutacijo c.427G→C, na eksonu 3, ki je bila pogostejša pri ženskah s POF, so označili kot škodljivo, saj zmanjša stabilnost proteina. Mutirana varianta proteina je večja, kar lahko vodi v strukturne nepravilnosti. Ta varianta sproži spremembo polarne AK v polarno AK s povečano hidrofobnostjo, je potencialno patogena in povzroča bolezen POF. Nahaja se sicer zunaj funkcionalne domene gena *FIGLA*, vendar pa so študije pokazale, da so tudi ostanki zunaj bHLH domene pomembni za interakcije med genom *FIGLA* in genom *TCF3*. Ta sprememba lahko vpliva na vezavno mesto *FIGLA* proteina in je povezana s funkcijo. Za varianto c.427G→C se je izkazalo, da igra vodenilo vlogo v POF patogenezi. Znanstvena stroka verjame, da je učinek vsakega posameznega genskega lokusa najverjetneje odvisen od drugih genetskih lokusov in okoljskih faktorjev (Tosh in sod., 2014).

Pred kratkim so odkrili, da delecija 22 bp pri ženskah s POF, povzroči nastanek novega bralnega okvirja v STOP kodonu, kar vodi v izgubo gena za protein *FIGLA*. Naknadne

analize v dvo-hibridnem sistemu kvasovk so pokazale, da ta delecija prekine vezavo FIGLA na TCF3 HLH domeno (Tosh in sod., 2014).

Soyal in sodelavci (2000) ter Bayne s svojo skupino (2004) pa so se posvetili preučevanju posledic ob neizražanju gena *FIGLA* pri miših. Utišanje (angl. *knock-out*) gena *FIGLA* je imel za posledico samice, ki so sicer imele normalno gonadogenezo, vendar je pri njih ob kotitvi prišlo do ogromne izgube jajčnih celic in neuspešne formacije PF (Bayne in sod., 2004). Miši so imele normalen izgled in oba spola sta pri 6. tednih starosti kazala normalno paritveno vedenje in znake kopulacije. V nasprotju z uspešnim parjenjem homozigotnih *FIGLA* null samcev in normalnih/heterozigotnih *FIGLA* null samic ter heterozigotnih samic in normalnih samcev, pa homozigotne *FIGLA* null samice, ki so se parile z normalnimi samci, niso kazale znakov brejosti in niso imele legla (Soyal in sod., 2000).

Pri *FIGLA* null miših se, za razliko od normalne folikulogeneze, v jajčnikih premer jajčnih celic ni povečal, somatske celice se niso vezale in obdale zarodnih celic in jajčne celice so začele propadati en dan po rojstvu. Nekaj posameznih jajčnih celic, ki so bile prisotne na periferiji gonad, je popolnoma degradiralo do 7. dneva starosti mladiča (Soyal in sod., 2000).

Vse strukture gonad (jajcevod, maternica in zgornja vagina) so bile prisotne pri popolnoma vseh samicah, vendar pa je bila velikost jajčnikov pri homozigotnih *FIGLA* null samicah bistveno manjša, jajčniki pa niso vsebovali jajčnih celic ali foliklov (Soyal in sod., 2000).

2.3.5 Časovni okviri izražanja transkripcijskega faktorja FIGLA

Pri človeku se gen *FIGLA* izrazi nekje v 14. tednu gestacijske starosti z dramatičnim porastom transkriptov/prepisov po polovici trajanja nosečnosti (19 tednov), ko se pri človeku oblikujejo PF (Pangas in Rajkovic, 2006).

Huntriss in sodelavci so predvideli, da se lahko določeni transkripti izražajo prehodno zgolj v določenih fazah zorenja jajčne celice. Posledično so poleg izolacije cDNA iz primordijalnih, primarnih in sekundarnih foliklov, izolirali tudi vzorce cDNA intermediarnih razvojnih stopenj. Rezultati so pokazali ekspresijo v vseh fazah ovarijskih foliklov (Huntriss in sod., 2002).

Prve nizke vsebnosti transkriptov *FIGLA* so zaznali pri ED13 mišjih zarodkih, kmalu po začetku spolnega dimorfizma gonad, ko ženske spolne celice začnejo prehajati v profazo I, kar so potrdili tudi Joshi in sodelavci (2007). Ogromen porast transkriptov se je pojavil na koncu zarodkovega razvoja in dosegel vrh približno dva dni po skotitvi. Nivo *FIGLA* mRNA je močno upadel med 7. in 14. dnem po kotitvi, v jajčnikih odraslih osebkov pa so bili transkripti komaj zaznavni (Soyal in sod., 2000).

Interakcija protein FIGLA – DNA je potrebna (toda ne sama po sebi zadostna) za ekspresijo genov ZP. Običajno so transkripti ZP2 prisotni v zgodnejših fazah oogeneze in v večji količini kot transkripti ZP1 in ZP3. V dotični raziskavi so transkripte ZP2 (ne pa tudi ZP3) v normalnih in heterozigotnih jajčnikih zaznali v ED19, v razvojnem času, ko so bili prisotni tudi transkripti FIGLA (Soyal in sod., 2000).

Proces formiranja PF je osnova za določitev reproduktivne življenjske dobe žensk in se pri ljudeh pojavi proti koncu sredine nosečnosti. Analize so pokazale, da se gen *FIGLA* izraža v jajčniku zarodka, ne pa tudi v drugih tkivih, in da ta ekspresija naraste v sredini nosečnosti, v obdobju formiranja foliklov. Ekspresijo gena *FIGLA* so Bayne in sodelavci določali v jajčniku človeškega zarodka v obdobju od 14. do 19. tedna nosečnosti. Pri 14. tednu starosti zarodka je bila ekspresija gena *FIGLA* nizka, od 17. do 19. tedna nosečnosti pa so zabeležili izreden porast ekspresije transkriptov *FIGLA* v jajčniku, ko pride tudi do začetka tvorbe PF (Bayne in sod., 2004).

Podoben porast gena *FIGLA* je opazen tudi pri miših in »knockout« študije tega gena kažejo na to, da je protein FIGLA potreben za formiranje PF in/ali preživetje jajčnih celic v tem času. Pri miših ekspresija gena *FIGLA* močno naraste med razvojem in ima vrh takoj po kotitvi, v nadaljevanju pa se vzdržuje nizek nivo transkriptov, kar je povezano z ekspresijo genov za ZP. Funkcija FIGLA pri miših je namreč povezana s heterodimerizacijo z bHLH proteinom E12. Analize z E12 človeškega zarodka in FIGLA proteini izraženimi *in vitro* so pokazale, da sta oba proteina potrebna za oblikovanje kompleksa v E-box-u ZP2 in da je za vezavno mesto ključen intakten E-box (Bayne in sod., 2004).

Protein FIGLA vpliva na porast količine različnih genov ob različnih časih – ekspresija ZP genov se začne po formaciji PF, geni, ki so potrebni za procese, ki vodijo v tvorjenje foliklov pa se morajo izražati prej. Da bi FIGLA sprožil transkripcijo teh različnih razredov genov ob primernem času, morajo sodelovati tudi drugi faktorji, specifični za določeno fazo (Bayne in sod., 2004).

2.3.6 Vpliv transkripcijskega faktorja FIGLA na ostale gene jajčne celice

Ovarijska folikulogeneza pri sesalcih je kompleksen proces, ki vključuje interakcije med somatskimi in zarodnimi celicami. Za uspeh procesa je potrebna previdno uglašena ekspresija TF, celičnih adhezijskih molekul in rastnih faktorjev. Faktor FIGLA ima vodilno vlogo v uravnavanju številnih genetskih hierarhij, vpletenih v folikulogenezo, oploditev in preimplantacijski razvoj. Vplivi FIGLA na ekspresijo genov so lahko direktni – regulacija tarčnih genov navzdol po kodirajoči verigi), ali pa indirektni – preko aktivacije (ali supresije) drugih TF (Joshi in sod., 2007).

Transkripcijski faktor (TF) FIGLA se *in vitro* veže v E-box v promotorjih ZP kot heterodimer z bHLH proteinom E12. Ta spada v razred A in regulira gensko ekspresijo ZP genov. Huntriss in sodelavci so primerjali analize ekspresije človeških FIGLA transkriptov s transkripti dveh človeških ZP genov (ZP2 in ZP3). Transkripte ZP3 so našli v vseh vzorcih človeških jajčnikovih foliklov, zrelih jajčnih celicah, pa tudi v predimplantacijskih zarodkih. Podoben vzorec ekspresije so našli tudi pri transkriptih gena ZP2 (Huntriss in sod., 2002). V raziskavi Joshi in sodelavcev je imel strukturni protein ZP2 večjo ekspresijo ob prisotnosti FIGLA. Kot pričakovano, se je ekspresija ZP2 in ZP3, že prej opisanih kot direktnih »downstream« tarč FIGLA, povečala v normalnih jajčnikih novoskotenih miši. Gen ZP2 kodira ključno komponento v ZP miši. Miši, ki nimajo ZP2, na začetku tvorijo tanko plast ZP, ki jo sestavljata ZP1 in ZP3. Ta matriks ni obstojen in ga pri ovuliranem jajčecu ZP ne zaznamo več, kar vodi v sterilnost mišjih samic (Joshi in sod., 2007). V primeru, da TF FIGLA ni izražen, je pri ljudeh odsotno izražanje genov ZP1, ZP2 in ZP3. Ker »knockouti« posameznih ZP genov niso prizadeti v zgodnji folikulogenezi, FIGLA najverjetneje regulira še nekatere druge gene v tej fazi (Pangas in Rajkovic, 2006). Družina genov za ZP in nanjo vezanih proteinov je pomembna za plodnost v odrasli dobi ženske. Pri ženskah se ZP1 in ZP3 izražata v jajčnih celicah večine PF, medtem ko je ZP2 zaznana le v tretjini PF. Pred študijo Fowler in sodelavcev, sta bila v jajčnikih človeških zarodkov zabeležena le nizka količina ZP1 in velike količine ZP3 od 11. tedna starosti dalje. Fowler in sodelavci pa so zaznali znatno povečanje količine ZP2 v starejših jajčnikih, protein pa so našli tudi v citoplazmi jajčnih celic, tesno povezanih z pregranuloznimi celicami in kot tanek pas na robu citoplazme jajčnih celic v nekaterih PF. Funkcija ZP genov v folikulogenezi ni poznana, saj imajo ZP null miši, čeprav so neplodne, normalne količine foliklov. Regulacija formiranja PF pri človeku tako kaže na pomembne razlike v primerjavi z mišmi (Fowler in sod., 2009).

Joshi in sodelavci so v FIGLA null jajčnikih novoskotenih miši natančneje preučili 176 genov, ki imajo ob prisotnosti FIGLA za posledico manjšo količino transkriptov (*up-regulated*), npr. *pou5f1*, *zp2*, *ivns1abp*, *vbp1*, *padi6*, *rbpms2*... in 44 genov, ki imajo zaradi prisotnosti FIGLA večjo količino transkriptov (*down-regulated*). Trinajst podrobneje preučenih genov se je močneje izražalo v normalnih kot pa v FIGLA null jajčnikih. Trije od teh genov so bili člani genske družine *nalp*, njihova ekspresija pa je specifična za jajčne celice; 5 je bilo genov z znano funkcijo, ki se izražajo specifično v jajčnih celicah, prav tako 5 je bilo tudi genov z nepoznano funkcijo (Joshi in sod., 2007). Fowlerja in sodelavce pa so, zaradi pomembne vloge, ki jo igrajo v signalizaciji človeških jajčnih celic pri formaciji PF, zanimali zlasti geni, katerih transkripcija se poveča in so specifični za jajčne celice. Analize so pokazale transkripte FIGLA in še nekaterih drugih genov, ki so znatno narasli od 18. do 20. tedna starosti zarodka. Tudi porast transkriptov gena ZP2 je bil zaznan, čeprav spremembe v količini proteina v tem primeru niso bile pomembne za raziskavo. Pri človeku so našli 61 transkriptov, katerih

količino prisotnost FIGLA poveča ter 5 transkriptov, katerih količina se ob prisotnosti TF FIGLA zmanjša in se izražajo na začetku oblikovanja PF. Imunohistokemija je pokazala, da so HSPD1, NALP5 in ZP2 specifični za jajčne celice v jajčnikih človeškega zarodka, čeprav ZP2 niso zaznali do 18. tedna gestacijske starosti zarodka. Raziskali so tudi številne povezave med različnimi faktorji, v najpomembnejši mreži povezav pa se je pokazalo, da estradiol posredno vpliva na FIGLA faktor (Fowler in sod., 2009).

Med vsemi geni, ki so jih identificirali Joshi in sodelavci, je bilo glede na funkcijo največ genov, ki so vezavni proteini za nukleinske kisline (vključno s TF), sledile so jim oksidoreduktaze, proteini citoskeleta in ligaze. Deset genov, ki so spadali v kategorijo »*down-regulated*« genov in katerih funkcije so razdeljene med vse zgoraj našteje skupine, ima vzorec ekspresije povezan tudi s spermiji (Joshi in sod., 2007).

V začetku formacije PF v človeškem zarodku se je povečala količina transkriptov številnih genov (številni od teh so specifični za jajčne celice). Največji porast v številu transkriptov se je pokazal pri genu *NALP5*. Med oblikovanjem PF so številni geni glodalčje *NALP* družine pokazali s FIGLA povezan porast v ekspresiji. Miši s FIGLA »knockout« omogočajo zanimiv vpogled v fiziologijo »*downstream*« signalizacije. V dotični študiji je bila FIGLA del omrežja, ki medsebojno povezuje *NALP5*, *ZP2*, *LHX8* in *SCYP1*. Poleg odsotnosti tvorbe PF, pride pri *FIGLA* null miših do pomanjkanja ekspresije *ZP1*, *ZP2* in *ZP3* ter popolne ali delne izgube petih *Nalp*-ov, vključno z *nalp5* (Fowler in sod, 2009). V jajčnikih novoskotenih normalnih miši so Joshi in sodelavci našli 5 *NALP* transkriptov, medtem ko pri *FIGLA* null miših niso našli nobenega od njih. Čeprav si člani genske družine *Nalp* delijo strukturne motive in se sočasno izražajo v jajčnih celicah, njihova prisotnost v celicah ni funkcionalno odveč. Inaktivacija enega gena (*Nalp5*, tudi *Mater – Maternal Antigen That Embryos Require*) je dovolj, da se preimplantacijski razvoj ustavi. Za uspešno embriogenezo so torej pomembni tudi proteinski produkti materinskih genov, ki se akumulirajo tekom rasti jajčnih celic. Genetske študije so že usmerjene v preučevanju tudi drugih *nalp* genov, ki jih regulira FIGLA in njihovih učinkov na preimplantacijo pri miših. Miši, ki nimajo *Mater* proteina, imajo normalno gonadogenezo in normalno oploditev, vendar pa razvoj zarodka poteka le do 2-celične faze. Josh in sodelavci so našli še en gen z materinskimi efekti – *dppa3 (stella)*, ki je prav tako pomemben za predimplantacijski razvoj in je v osnovi vpleten v specifikacije linije zarodnih celic (Joshi in sod., 2007).

Med ostalimi geni s poznano funkcijo, ki so jih podrobneje preučili Joshi in sodelavci, so se vsi preferenčno izražali v jajčnikih. Gene *Oas1d*, *Serpinb6C* in *Arhgap20*, *Pdzk1* in *Elavl2* so najprej zaznali v jajčnikih novoskotenih mladičev, kjer je njihova ekspresija odvisna od FIGLA, v majhnih količinah pa so se izražali tudi v nekaterih drugih tkivih. To potrjuje domnevo, da so omenjeni geni neposredne »*downstream*« tarče FIGLA, se pa njihovi transkripti nahajajo tudi v odraslih tkivih. Pri razvoju in

organsko-specifični ekspresiji torej igrajo pomembno vlogo tudi drugi TF. Gensko spremenjene miši, ki niso izražale OAS1D, so plodne, vendar pa se njihova plodnost zmanjšuje z zmanjšano ovulacijsko kapaciteto in napakami v zgodnjem embrionalnem razvoju. Miši, ki ne izražajo PDZK1, ki je vpleten v nadzorovan ionski transport in metabolizem holesterola, so normalno plodne (Joshi in sod., 2007).

Transkripte osmih »*up-regulated*« genov (*pou5f1*, *dppa3*, *oas1h*, *padi6*, ...) so našli v normalnih, ne pa tudi v *FIGLA* null jajčnikih novoskotenih miši. Zaznali so jih zgolj v ovarijskem tkivu, z izjemo *pou5f1*, ki so bili prisotni tudi v testisih. Gen *pou5f1* (*oct4*) se med razvojem miši izraža v pluripotentnih celicah, preden se omeji na zarodne celice in regulira številne tarčne gene, ki ležijo navzdol v kodirajoči verigi, samostojno ali v paru z drugimi TF. Kompleksni vzorec POU5F1 transkriptov v normalnih in *FIGLA* null miših kaže na sodelovanje drugih TF v kontroli njegove ekspresije. Izražanje gena *pou5f1* (*oct4*) v primordialnih oogonijih je ob prisotnosti *FIGLA* povečano. Perinatalno, količina transkriptov *pou5f1* naraste v rastočih jajčnih celicah in vztraja v zgodnjem zarodku (4-celični zarodek). Čeprav so na začetku transkripti POU5F1 prisotni v vseh blastomerah, se kasneje omejuje na notranjo celično maso, epiblast in primordiale zarodne celice. V *FIGLA* null miših je ekspresija *pou5f1* zmanjšana. To potrjuje trditev, da je *FIGLA* regulator ekspresije *pou5f1* v ženskih zarodnih celicah, čeprav so potrebni tudi drugi faktorji. Gen *oas1h* kodira 2'5'-oligoadenilat sintazo in se veže z *oas1d* skupaj še s 6 sorodnimi sintazami. Gen *padi6* (*padi5*) je eden iz skupine *padi* genov pri miših, ki kodira peptidilarginin deiminazo, ki pretvarja argininske ostanke v citrulin. Izraža se med oogenezo, kjer je povezan s citoplazmo in ohranjanjem proteina v zgodnjem zarodku do razvojne faze blastociste (Joshi in sod., 2007).

2.4 KRIOPREZERVACIJA JAJČNIH CELIC

Pri krioprezervaciji jajčnih celic se poslužujejo dveh glavnih metod: počasnega zamrzovanja in vitrifikacije (z odprtim ali zaprtim sistemom). Pri protokolih počasnega zamrzovanja so jajčne celice postopno zamrznjene ob prisotnosti nizkih koncentracij krioprotektantov, kar zmanjša tveganje znotrajceličnega tvorjenja ledenih kristalov (Bianchi in sod., 2014). Glavni problemi pri počasnem zamrzovanju so povezani z nekaj ur trajajočim postopkom in drago opremo (poseben aparat za ohlajanje v parah tekočega dušika), ki je potrebna za opravljanje postopka, zato te metode ni mogoče izvesti v vsakem laboratoriju (Herraiz in sod., 2014). Vse izboljšave te metode so temeljile na izbiri krioprotektantov in njihovi koncentraciji ter času izpostavljenosti vzorca krioprotektantu (Bianchi in sod., 2014).

Vitrifikacija je novejši postopek, ki združuje ultrahitro ohlajanje (neposredni potop v tekoči dušik pri -196°C) z minimalnim volumnom vitrifikacijske raztopine in visoko koncentriranimi krioprotektanti (Bianchi in sod., 2014), s čimer se izognemo indukciji

apoptotičnih procesov po devitrifikaciji tkiva (Herraiz in sod., 2014). Pri vitrifikaciji namreč ne pride do tvorbe ledenih kristalov, ki povzročijo mehanske poškodbe celice (Suzuki in sod., 2015), led pa se ne tvori niti med segrevanjem. Gre za proces, v katerem raztopina in celice v njej otdrijo med ohlajanjem in tvorijo transparentno amorfno »steklo« (Wood, 2012). Postopek je zanimiv, ker je hiter in enostaven, prav tako zanj ne potrebujemo posebne in drage opreme (Suzuki in sod., 2015). Postopek se lahko izvede celo med samo operacijo ooforektomije (Herraiz in sod., 2014).

Glavna slabost vitrifikacije v praksi je potreba po suspenziranju jajčnih celic v koncentriranih raztopinah krioprotektantov. To poveča tveganje za kemične poškodbe in osmotsko škodo, ki nastane, ko voda in krioprotektanti prehajajo v ali iz celice (Wood, 2012). Da bi zmanjšali toksičnost krioprotektantov, brez da bi vplivali na lastnosti vitrifikacije, lahko kombiniramo relativno nizke koncentracije različnih krioprotektantov. Minimalni volumen vitrifikacijske raztopine, v kateri je vzorec, lahko maksimizira hitrost ohlajanja in zmanjša toksičnost vitrifikacijske raztopine z manj koncentriranimi krioprotektanti (Sanfilippo in sod., 2015). So pa majhni vitrificirani vzorci, v primerjavi s počasnim zamrzovanjem, izpostavljeni večjemu tveganju zaradi nenačrtovanega segrevanja do letalnih temperatur (nad -130°C) (Wood, 2012).

Zaradi pomembnih tehnoloških napredkov v zadnjih dveh desetletjih je danes krioprezervacija človeških jajčnih celic uporabna v klinični praksi. Za razliko od krioprezervacije zarodka, je krioprezervacija jajčnih celic primerna tudi ob odsotnosti moškega partnerja, hkrati pa zaobide etična in pravna vprašanja povezana z zarodki (Bianchi in sod., 2014).

2.4.1 Razlogi za krioprezervacijo jajčnih celic

Shranjevanje jajčnih celic za vitrifikacijo se je izkazalo za zelo učinkovito MAR. Vitrifikacija jajčnih celic se dandanes ponuja kot opcija za ženske, ki želijo ohraniti svoje gamete, da bi lahko spočele v prihodnosti in tako imele genetsko svoje potomce (Cobo in sod., 2016). Ta metoda je najbolj uporabna za onkološke pacientke, ki so izpostavljene kemoterapiji ali radioterapiji in za pacientke, pri katerih je povečano tveganje izgube plodnostnega potenciala zaradi prezgodnje odpovedi jajčnikov (Nagy in sod., 2017) ali gonadotoksičnih zdravljenj (Cobo in sod., 2016). Prav tako se je povečala uporaba metode pri ženskah, ki odlašajo z nosečnostjo zaradi nezdravstvenih razlogov, npr. izobrazbe, zdravja ali kariere (Nagy in sod., 2017). Vitrifikacija jajčnih celic je torej zelo priročna tudi za ženske, ki želijo nosečnost preložiti zaradi t.i. »socialnih razlogov«. Tovrstne tehnike zato imenujemo tudi izbirno ohranjanje plodnosti (EFP). Izbirno ohranjanje plodnosti (EFP) omogoča ženskam premestiti nekatera medicinska stanja, ki lahko ogrožajo njihovo plodnost v prihodnosti, npr. endometrioza ali druge spremembe, ki vodijo v prezgodnjo menopavzo. Obstajajo še

druga stanja, v katerih nosečnost ni priporočljiva, kot npr. iatrogena zdravljenja, avtoimune bolezni ali celo klinične situacije, ki potrebujejo postopek bilateralne ovarijektomije. Bolezni, ki so pogost vzrok za vitrifikacijo jajčnih celic so še transverzni mielitis, golšavost in multiplaskleroza. Pri ženskah, ki se odločijo za vitrifikacijo jajčnih celic iz socialnih razlogov, gre najpogosteje za neobstoj partnerja, reševanje finančnih težav in težav v karieri (Cobo in sod., 2016).

Krioprezervacija jajčnih celic je široko razširjen pristop za ohranjanje plodnosti pri ženskah in zagotavlja številne nenadomestljive prednosti. Poleg že zgoraj naštetih, odpravi nekatere etične in pravne zadržke povezane s krioprezervacijo zarodkov. Shranjevanje jajčnih celic naredi program doniranja jajčnih celic bolj priročen in učinkovit ter omogoči ponovne postopke IVF pri pacientkah, ki nimajo na voljo partnerja za oploditev (Sun in sod., 2015).

2.4.2. Vplivi vitrifikacije na strukturo jajčne celice

Ekstremne razmere, ki nastanejo zaradi vitrifikacije kot je npr. osmotski stres in toksičnost krioprotektantov, lahko vplivajo na številne strukture jajčne celice, npr. ZP, aktinske filamente, delitveno vreteno in mitohondrije (MTH) (Nohales-Córcóles in sod., 2016). Zrele jajčne celice v MII, ki so najpogosteje uporabljene za krioprezervacijo, so med največjimi celicami v človeškem telesu in vsebujejo občutljivo delitveno vreteno. Ker njihova citoplazma vsebuje visoke deleže vode v primerjavi z drugimi telesnimi celicami, so glavni problem po postopku krioprezervacije predstavljale poškodbe, ki so nastale zaradi formiranja ledenih kristalov. Krioprezervacija zrelih jajčnih celic lahko povzroči tudi otrdevanje ZP (angl. *zona pellucida hardening*), kar ovira oploditev (Bianchi in sod., 2014). Jajčne celice so zelo občutljive na temperaturne spremembe in osmotski tlak. Med vitrifikacijo jajčna celica ohrani nekaj metabolne aktivnosti, ki je lahko prizadeta, zaradi nenadne spremembe temperature iz temperature kulture (37°C) na temperaturo pre-ekvilibracijske raztopine (sobna temperatura). Krioprezervacijske raztopine so zelo hlapljive in lahko povzročijo nenadno spremembo v osmotskem tlaku, prav tako krioprotektanti delujejo toksično na jajčno celico v času, ki je potreben za ohranitev oblike jajčne celice (Liu in sod., 2017).

Ko so Bianchi in sodelavci analizirali jajčne celice s svetlobnim mikroskopom in presevnim elektronskim mikroskopom so vse celice – sveže (CO – ang. *Fresh Control Oocytes*), počasi zamrznjene (SFO – ang. *Slow Frozen/thawed Oocytes*) in vitrificirane (VO – ang. *Vitrified/warmed Oocytes*) imele po postopku normalno obliko, dimenzije in teksturo ooplazme. V celicah SFO so opazili rahlo do zmerno vakuolizacijo v citoplazmi, pri VO celicah je bila vakuolizacija rahla, medtem ko so bile v CO celicah vakuole skoraj popolnoma odsotne. To pomeni različno občutljivost teh dveh skupin jajčnih celic na krio-poškodbe in boljšo ohranjenost normalne strukture sveže celice po

vitrifikaciji. Vakuolizacija je pomembna sprememba, ki jo pogosto zaznajo v zrelih človeških jajčnih celicah, ki so tretirane z različnimi protokoli zamrzovanja. Gre za nespecifičen odziv jajčnih celic na temperaturne, osmotske in/ali kemične poškodbe, ki se lahko pojavijo pri krioprezervaciji. Prisotnost vakuol v človeških jajčnih celicah je najverjetneje povezana z zmanjšano sposobnostjo oploditve jajčne celice in slabšim razvojem zarodka. Rezultati primerjalnih analiz, ki so jih opravili Bianchi in sodelavci, potrjujejo povezavo med počasnim zamrzovanjem in prisotnostjo vakuol v jajčnih celicah (Bianchi in sod., 2014).

Kar nekaj študij je poročalo o tem, da vitrifikacija vpliva na morfologijo MTH v jajčnih celicah, jih poškoduje ali pa imajo spremembe njihove razporeditve močan vpliv na viabilnost in razvoj jajčnih celic. Tudi v študiji Cao in sodelavcev se je po vitrifikaciji povečal delež GV jajčnih celic, ki so pokazale nenormalno distribucijo MTH. Pri večini nezrelih jajčnih celic z retikularno mrežo so se majhne granule povezale z vdolbinicami v citoplazmi, ki je lahko relativno brez MTH ali vsebuje neaktivne MTH. Zrele jajčne celice so imele v citoplazmi večje skupke MTH, ki so tvorili tubularne vzorce, zato se je povečala intenziteta fluorescence. Pri več vrstah so poročali o relokaciji aktivnih MTH med zorenjem jajčne celice. Raziskovalci so dokazali, da imajo zrele jajčne celice odraslih ovc višji odstotek skupkov MTH v citoplazmi v primerjavi z nedoraslimi ovcami. Razporeditev skupkov MTH v odraslih MII jajčnih celicah je pokazala višji nivo adenzin trifosfata (ATP) in razvojno kompetenco, kar nakazuje na to, da je združevanje MTH povezano s povečano mitohondrijsko aktivnostjo in višjo koncentracijo ATP. Difuzni, nezdruženi MTH pa kažejo na njihovo nizko aktivnost, kar je povezano z nizko koncentracijo ATP (Cao in sod., 2017).

Spremembe v razporeditvi MTH po devitifikaciji GV jajčnih celic so opazili že pri miših, prašičih in govedu. Disfunkcija MTH v jajčni celici ogrozi razvojne dogodke z induciranjem kromosomskih sprememb in sproži apoptozo v zarodku. Študija Cao in sodelavcev je pokazala, da je delež devitificiranih jajčnih celic z nenormalno distribucijo MTH mnogo višji kot pri svežih jajčnih celicah. Tudi prejšnje študije so že pokazale, da v človeških jajčnih celicah translokacija MTH ni prizadeta ob ustreznem tretiranju. Do enakih zaključkov so prišli tudi ob primernem tretiranju nezrelih jajčnih celic mačk. Študije na prašičjih, govejih in konjskih jajčnih celicah so pokazale, da izpostavljenost krioprotektantom poškoduje MTH, ki postanejo grobi, razpršeni in razpokani. To lahko vpliva na zmanjšano razvojno kapaciteto po krioprezervaciji jajčnih celic in ima lahko za posledico neželene učinke na potomstvu, ki izhaja iz IVF jajčnih celic (Cao in sod., 2017). V raziskavi Nohales-Córcoles in sodelavcev so po vitrifikaciji največkrat opazili mešano distribucijo MTH (kombinacija granul in skupkov ter gladke in homogene distribucije), ki je bila vidna v vseh jajčnih celicah. Granularna distribucija je bila najpogostejša pod plazemsko membrano, gladka distribucija pa proti centru jajčne celice. Vzorec združevanja MTH ni bil povezan z njihovo aktivnostjo. Jajčne celice tako mladih kot starejših žensk so imele podoben vzorec razporeditve, osmotska

dehidracija in krčenje jajčne celice zaradi krioprotektantov pa ni vplivala na njihovo razporeditev po devitrifikaciji (Nohales-Córcoles in sod., 2016). Razporeditev MTH igra pomembno vlogo v citoplazmi jajčne celice in je povezana z zorenjem citoplazme ter razvojno kompetenco, ki se podeduje po materini strani. Konfiguracija delitvenega vretena in razporejanje kromosomov tekom mejotske metafaze pa sta občutljiva na temperaturne spremembe. To vpliva na neurejenost delitvenega vretena in kromosomov, ki je povezana z embrionalno poliploidijo (Liu in sod., 2017).

Glede na faktorje, kakršen je npr. velika količina citoplazme v jajčni celici, je pri vitrifikaciji jajčnih celic, v primerjavi z vitrifikacijo zarodkov, zaradi uporabe toksičnih krioprotektantov večja možnost poškodb delitvenega vretena v metafazi mejoze (Liu in sod., 2017). Vitrifikacija hitro vodi v poškodbe delitvenega vretena tako v *in vivo* zorjenih kot IVM jajčnih celicah, za nezrele jajčne celice pa so poročila različna. Jajčne celice z normalnim delitvenim vretenom imajo višji potencial za razvoj, gostota delitvenega vretena pa je neposredno povezana z razvojem zarodka (Song in sod., 2016). Vendar pa lahko stabilen osmotski pritisk in konstantna temperatura močno zmanjšata škodljive učinke procesov zamrzovanja in odmrzovanja na delitveno vreteno in razporeditev DNA, saj se poveča hitrost gibanja molekul, zato je lahko inkubacija celic v krioprotektantih krajša, kar so dokazali Liu in sodelavci v svoji raziskavi (Liu in sod., 2017). Delitveno vreteno je bilo v raziskavi Bianchi in sodelavcev normalno oblikovano in primerno pozicionirano tako v CO, kot tudi SFO in VO celicah. To potrjuje, da so spremembe delitvenega vretena, ki se včasih pojavijo med krioprezervacijo, lahko tudi povratne (Bianchi in sod., 2014).

Kot pomembna pokazatelja kvalitete jajčne celice sta se pokazali tudi debelina in gostota ZP, saj lahko odražata razvojni potencial, nista pa povezani s stopnjo delitve zarodka. Nivo pojavljanja delitvenega vretena in kasneje razvojni potencial (zaustavitve razvoja) ter stopnja delitve zarodka, so bili bistveno višji v skupinah *in vivo* in IVM celic kot pa pri nezrelih jajčnih celicah. Gostota ZP je bila bistveno nižja pri *in vivo* zorjenih jajčnih celicah v primerjavi z IVM in nezrelimi jajčnimi celicami, na debelino ZP pa vitrifikacija ne vpliva. V vseh treh skupinah, ki so jih opazovali Song in sodelavci (*in vivo* zorjene jajčne celice, IVM jajčne celice in nezrele jajčne celice), je bila gostota ZP po devitrifikaciji bistveno večja kot pred vitrifikacijo. To kaže na to, da vitrifikacija lahko poveča gostoto ZP (Song in sod., 2016).

2.4.3 Vplivi vitrifikacije na delovanje jajčne celice

Preživetje jajčnih celic po zamrzovanju je tesno povezano s sestavo in permeabilnimi lastnostmi celične membrane, razmerjem med površino in volumnom (P:V) celice in razlikami v osmotskem pritisku na obeh straneh membrane. Dodatni faktorji, ki vplivajo na preživetje jajčnih celic in njihovo sposobnost razvoja po zamrzovanju so še razvojna

faza v času zamrzovanja, tip krioprotektanta in njegova koncentracija ter metoda oziroma postopek krioprezervacije (Bianchi in sod., 2014).

Bianchi in sodelavci so odkrili, da so skupki MTH in gladkega endoplazemskega retikla (M-SER) ter kompleksi MTH in veziklov (MV) po določenem času inkubacije najpogostejši organeli v vseh celicah (CO, SFO in VO). Le zrele, MII jajčne celice, kažejo popolnoma organizirane skupke M-SER različnih velikosti, ki lahko regulirajo nivo kalcija (Ca^{2+}) in produkcijo ATP v MTH ter ob oploditvi prispevajo k uravnavanju poti signalne transdukcije, odvisne od Ca^{2+} . Skupki M-SER mogoče sodelujejo pri proizvodnji substanc potrebnih za oploditev in/ali hitre formacije membrane tekom zgodnje embriogeneze. Bianchi in sodelavci so v študiji opazili tudi, da so v jajčnih celicah, ki so bile na gojišču dalj časa kot sicer, skupke M-SER delno nadomestili kompleksi MV. Pride lahko torej do »recikliranja« intracelularne membrane, kar povzroči večjo ekskrecijo MV kompleksov, ki prispevajo k obnavljanju membrane SER. Spremembe v MV kompleksih in SER so torej povezane s fazo zrelosti jajčnih celic na začetku inkubacije celic ter dolžino inkubacije po odmrzovanju/segrevanju (Bianchi in sod., 2014).

Bianchi in sodelavci so odkrili bistveno manjšo količino in gostoto kortikalnih granul (CG) v obeh, SFO in VO celicah, v primerjavi s CO celicami. Prisotnost CG v zrelih jajčnih celicah večine sesalcev, tudi človeka, je nekaj povsem normalnega. Običajno so razvrščene v eno do tri plasti v podplazmalemskem območju. To so organeli, ki nastajajo na Golgijevem aparatu (GA) in so obdani z membrano. Tvorijo se v zgodnjih fazah rasti jajčne celice ter vsebujejo glikozaminoglikane, proteaze, kisle fosfataze in peroksidaze. Ob oploditvi pride v aktivirani jajčni celici do hitre in masovne eksocitoze CG v PVS, kar vodi v otrdevanje notranje strani ZP in posledično zaviranja morebitne penetracije več spermijev v jajčno celico (polispermije). Prehajanje Ca^{2+} ob oploditvi je očitno vpleteno v sprožitev fuzije CG z oolemo, posledično pa pride do sproščanja njihove vsebine v PVS. Nenavadna aktivacija jajčne celice se lahko pojavi med krioprezervacijo, ne glede na uporabljen protokol (počasno zamrzovanje, vitrifikacija z zaprtim ali odprtim sistemom). Ta aktivacija vodi v prezgodnjo eksocitozo CG in posledično razpršeno otrdevanje ZP, kar močno zmanjša možnost za oploditev jajčne celice (Bianchi in sod., 2014).

Skupina Cao in sodelavcev je preiskovala lisičje jajčne celice, ki so jih razdelili na tri skupine: 1) sveže jajčne celice, ki so služile kot kontrola (oznaka skupine: C); 2) jajčne celice, ki so jih izpostavili ekvilibracijski in vitrifikacijski raztopini, a jih niso potopili v tekoči dušik (oznaka skupine: E) in 3) jajčne celice, ki so jih vitrificirali, jih za 3 dni shranili v tekoči dušik in nato devitificirali (oznaka skupine: V-W). Rezultati raziskave so pokazali, da je bila količina citoplazemskega glutationa (GSH) bistveno nižja v skupini V-W jajčnih celic kot v skupinah C in E, kar ima lahko škodljiv učinek na nadaljnji embrionalni razvoj. Sinteza GSH namreč predstavlja predpogoj za

dekondenzacijo kromatina spermija in formacijo moških pronukleusov v oplojeni jajčni celici. Prav tako je pomembna za transport AK, regulacijo proteinov in sintezo DNA s spreminjanjem redoks stanja ter omogoča zaščito delitvenega vretena pred oksidativnimi poškodbami in ohranjanje strukture delitvenega vretena. Produkcija GSH temelji na ATP-odvisni de novo sintezi med zorenjem jajčne celice, ATP pa nastaja v MTH z oksidativno fosforilacijo v ciklu citronske kisline (Cao in sod., 2017). Mitohondriji (MTH) so ključni organeli, vključeni v številne celične aktivnosti, v sesalcih jajčnih celicah pa predstavljajo vir reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) in prostih radikalov celo v normalnih fizioloških razmerah. Vitrifikacija spodbudi spremembe v razporeditvi MTH in zmanjša MTH potencial v mišjih in tudi človeških jajčnih celicah (Nohales-Córcoles in sod., 2016), vpliva na aktivnost MTH in v nekaterih vrstah zmanjša koncentracijo ATP (Cao in sod., 2017). To je lahko razlog za povečanje nivoja ROS, ki so ga opazili pri devitrificiranih jajčnih celicah. Krioprezervacija torej znatno poveča proizvodnjo ROS v jajčnih celicah mladih miši, ne pa tudi starejših in zmanjša število transkriptov za proteine, ki so vključeni v redoks homeostazo, kot je npr. tioredoksin reduktaza I v človeških jajčnih celicah. Kljub dejstvu, da so ROS ključni dejavniki številnih celičnih procesov, nesposobnost antioksidativne obrambe pri zaustavljanju nastajanja ROS, povzroči biokemijsko neravnovesje, ki ga poznamo pod izrazom oksidativni stres. Ta lahko moti številne celične komponente in aktivnosti, kar običajno vodi v razvojne blokade in celično smrt. Povečan nivo ROS v svežih mišjih jajčnih celicah starejših samičk v primerjavi z mlajšimi, v eni izmed študij, je najverjetneje posledica zmanjšane sposobnosti soočanja s stresom. Do podobnih dognanj so prišli tudi v študijah prašičev, v govejih jajčnih celicah pa so našli slabši antioksidativni sistem. Nasprotno, so v svežih in devitrificiranih jajčnih celicah mladih in starejših žensk odkrili podoben nivo ROS. Čeprav v dotični študiji ni bilo statistično pomembnih razlik v vitrificiranih jajčnih celicah, se kaže trend povečanja oksidacije (Nohales-Córcoles in sod., 2016).

Cao in sodelavci so sklepali, da poškodbe MTH zmanjšajo vsebnost ATP in s tem zmanjšajo koncentracijo GSH v jajčnih celicah, kar zniža razvojni potencial zarodka, o čemer so poročali že pri miših, kozah, govedu, prašičih in psih. Nizek nivo GSH v citoplazmi lahko spremeni redoks stanje in prispeva k poškodbam formacije delitvenega vretena in kromosomske segregacije, medtem ko pride do poškodb mikrotubulov, ki so vpleteni v translokacijo MTH. Te citoplazemske napake skupaj zmanjšajo razvojno kapaciteto jajčnih celic po IVM (Cao in sod., 2017). Pri živalskih modelih so poškodbe DNA hujše pri vitrificiranih IVM jajčnih celicah kot pri vitrificiranih *in vivo* zorjenih jajčnih celicah, za človeka pa tovrstnih podatkov še ni. Stopnja pojavljanja delitvenega vretena po odmrzovanju, razvojni potencial in stopnja delitev zarodka so bili bistveno nižji pri nezrelih jajčnih celicah kot v *in vivo* zorjenih in IVM jajčnih celicah, ni pa bilo statističnih razlik med skupinami glede stopnje aneuploidij. Rezultati Songa in sodelavcev tako kažejo na to, da so vitrificirane zrele jajčne celice boljše kot

vitificirane nezrele jajčne celice, nižja stopnja pojavljanja delitvenega vretena in razvojni potencial zarodka pa sta lahko povezana s poškodbami DNA v vitificiranih nezrelih jajčnih celicah (Song in sod., 2016).

Rezultati Cao in sodelavcev kažejo na to, da vitifikacija v odprtem sistemu – slamicah, nima vpliva na zorenje jedra v lisičjih jajčnih celicah, podobne rezultate pa so opazili tudi v študijah jajčnih celic prašičev, koz in miši. Čeprav vitifikacija nezrelih jajčnih celic ne vpliva na zorenje jedra, so opazili številne pomembne pomanjkljivosti v vzdrževanju kromosomske organizacije jajčne celice in aneuploidije. Izpostavljenost prašičjih GV jajčnih celic vitifikaciji ima pomemben učinek na delitveno vreteno in konfiguracijo kromosomov, podobna opažanja pa so bila zabeležena tudi pri miših in ovcah. Nekateri raziskovalci so odkrili, da vitifikacija GV jajčnih celic lahko vodi v slabšo kohezijo centromer in povečano stopnjo aneuploidij (Cao in sod., 2017).

Po vitifikaciji jajčnih celic se kaže zmanjšan razvojni potencial zaradi manjšega števila delitev in uporabnih blastocist, kar kaže na to, da lahko krioprezervacijski postopki ogrozijo fiziologijo jajčne celice. Vitifikacija ima učinke tudi na homeostazo Ca^{2+} ter indukcijo in sproščanje CG. Tako počasno zamrzovanje kot vitifikacija, imata negativne učinke na ekspresijo genov, vključenih v regulacijo strukture DNA, napredovanje celičnega cikla, homeostazo MTH in produkcijo energije. Te spremembe lahko predstavljajo izziv za ženske v pozni fazi svojega reproduktivnega razvoja, saj lahko vplivajo na kvaliteto jajčnih celic in slabšo sposobnost odzivanja na stres. Z višanjem starosti ženske se povečuje tudi stopnja mejotskih aberacij in aneuploidij, kot posledica spremenjene aktivnosti MTH, kar lahko pripelje do nepravilnih formacij delitvenega vretena, zmanjšane sposobnosti obrambe pred ROS, skupaj s povečano ekspresijo apoptotskih markerjev in nižjo ekspresijo molekul, ki so povezane s produkcijo energije in odzivom na stres (Nohales-Córcoles in sod., 2016).

Za raziskovanje mitohondrijskega membranskega potenciala so uporabili JC-1 metodo, ki meri razmerje med rdečo (aktivni in delujoči MTH) in zeleno (nedelujoči in neaktivni MTH) fluorescenco. Tako sveže kot devitificirane jajčne celice mladih in starejših žensk so pokazale zelo podobno razmerje JC-1, zato lahko sklepamo, da vitifikacija ne glede na starost, ne povzroča sprememb v aktivnosti MTH. Tudi starost sama po sebi ne zmanjša aktivnosti MTH (Nohales-Córcoles in sod., 2016).

Teoretično naj bi nizka fluorescenca DCF (z diklorofluorescinom) odražala nizek nivo intracelularnih ROS vrst, medtem ko intenzivnejša fluorescenca DCF kaže na visoke vrednosti ROS. Sveže jajčne celice mladih in reprodukcijsko doraslih žensk so pokazale približno enako intenziteto slikovnih točk (pikslov). Povišana DCF fluorescenca je bila prisotna pri vitificiranih jajčnih celicah tako mladih kot starejših žensk, vendar zaradi visoke raznolikosti v DCF fluorescenci med vitificiranimi jajčnimi celicami, ni bilo opažene statistično pomembne razlike. Sveže jajčne celice mladih in starejših pacientk so imele podobno redoks stanje, ki kaže na to, da starost ne vpliva na znotrajcelično

redoks stanje. Nasprotno je bilo v vitrificiranih jajčnih celicah obeh skupin opaženo višje razmerje med flavinadinindinukleotidom (FAD) in nikotinamid adenin dinukleotidom (NADH) (»redoks razmerje«), saj je vitrifikacija, ne glede na starost, povzročila oksidacijo znotrajceličnega redoks potenciala (Nohales-Córcoles in sod., 2016).

Znano je, da MTH igrajo vodilno vlogo v kompetenci jajčne celice. Nujni so za proizvodnjo energije, ki je potrebna za usklajeno delovanje celičnih procesov, kot sta npr. programirana celična smrt ali oblikovanje delitvenega vretena. Adenozin trifosfat (ATP) nastaja z oksidacijo metabolitov v citosolu (glikoliza, proteoliza in lipoliza) ali v MTH z oksidativno fosforilacijo. V MTH se energija shranjuje v obliki električnega membranskega potenciala, ki se vzpostavi z delovanjem encimov respiratorne verige, ki pretvarjajo ADP v ATP. Znano je tudi, da vitrifikacija inducira nenormalno razporeditev MTH in zmanjša njihovo aktivnost v mišjih jajčnih celicah, v govejih jajčnih celicah pa se zaradi vitrifikacije zmanjša količina ATP. Čeprav mitohondrijski potencial ni bil prizadet z vitrifikacijskim postopkom, je metabolizem MTH v vitrificiranih jajčnih celicah prizadet, kar se kaže z jasno oksidacijo FAD po vitrifikaciji. Tovrstne oksidacije mitohondrijskega redoks potenciala se lahko odražajo v nižjih nivojih citosolnega ATP (Nohales-Córcoles in sod., 2016).

Pri miših lahko vitrifikacija povzroči zmanjšan vnos nutrientov, ki naj bi se odražal v intracelularnem redoks potencialu. Sveže jajčne celice mladih in starejših žensk so imele podobno intracelularno redoks stanje, kar nakazuje na podoben citosolni ali oksidativni metabolizem MTH, kljub povečanemu razmerju FAD/NADH po vitrifikaciji, pa spremembe niso povezali s starostjo ženske. Povečana oksidacija FADH₂ kaže na to, da je mitohondrijski redoks potencial bolj oksidiran po vitrifikaciji, kar je lahko povezano s prenehanjem delovanja MTH, pomanjkanjem intermediatov za Krebsov cikel ali bolj uničujoče in generalne oksidacije MTH. Oksidativni stres ima za posledico oksidacijo NADH, torej znižuje intracelularni nivo NADH pred začetkom apoptoze. Spremembe v razmerju FAD/NADH se bodo tako ob produkciji ROS in celičnem oksidativnem stresu povečale. Zmanjšan nivo citosolnega NADH odraža povečano oksidacijo v citosolu, ki bi lahko bila posledica zmanjšanja GSH, torej zmanjšane antioksidativne obrambe, kar bi se odražalo v večjih količinah ROS. Dodatni učinki oslabljenih antioksidativnih obrambnih mehanizmov, povišanih ROS in večjega oksidativnega stresa so sprožili znatne spremembe v redoks ravnovesju. Spremenjeno redoks ravnovesje so imele tako jajčne celice mladih kot starejših žensk, zato sklepamo, da leta ne vplivajo na občutljivost jajčnih celic na vitrifikacijo (Nohales-Córcoles in sod., 2016).

Čeprav se v povezavi s preživetjem jajčnih celic in kvaliteto zarodkov še pojavljajo nepravilnosti in poškodbe, je stopnja nosečnosti po vitrifikaciji primerljiva z nosečnostmi iz svežih jajčnih celic. Spreminjanje redoks potenciala bi lahko kazalo na

višje oksidativno stanje v jajčnih celicah po postopku vitrifikacije, kar bi sčasoma lahko poslabšalo razvoj zarodka do blastociste (Nohales-Córcoles in sod., 2016).

V študiji, ki so jo naredili Wiesak in sodelavci, je bil znatno prizadet razvojni potencial vitrificiranih ovčjih jajčnih celic. Goveje jajčne celice, vitrificirane z dimetil sulfoksidom (DMSO) in etilen glikolom (EG) kot krioprotektantom, pa so pokazale zmanjšano stopnjo delitev in razvoja zarodkov v primerjavi s svežimi jajčnimi celicami. Vitrifikacija in prisotnost Ca^{2+} v vitrifikacijski raztopini (VS) je vplivala na razvojno kinetiko govejih zarodkov, ki so nastali iz IVM in vitrificiranih jajčnih celic. Razvojni potencial vitrificiranih jajčnih celic za doseg stopnje blastociste je bil nižji v primerjavi z nevitrificiranimi jajčnimi celicami. Učinek vitrifikacije na kinetiko zarodka je bil opazen na stopnji morule, a ne v dogodkih zgodnjega razvoja zarodka (Wiesak in sod., 2017).

Prisotnost Ca^{2+} v VS najverjetneje povzroči neustrezno aktivacijo od Ca^{2+} odvisnih encimov, kot so proteaze in fosfolipaze. To ima kar nekaj celičnih posledic za razvoj zarodka. Čas med prvo in drugo delitvijo se podaljša, trajanje prve delitve se skrajša, nobeden od zarodkov pa ne doseže razvojne stopnje morule. Postopka vitrifikacije in devitrifikacije nista vplivala na notranji in zunanji premer jajčnih celic in debelino ZP ter ekspresijo FST in katepsina B (CTSB) v IVM govejih jajčnih celicah. Vitrifikacija sproži otrdevanje ZP zrelih in nezrelih govejih jajčnih celic, zaradi česar je za uspešnejšo oploditev potrebna metoda ICSI (metoda neposrednega vnosa semenčice v jajčno celico). Prisotnost Ca^{2+} v VS okrepi otrdevanje ZP in vpliva na količino mRNA za FST in CTSB v jajčnih celicah, s čimer ovira razvojno kompetenco govejih jajčnih celic. Posledično prisotnost Ca^{2+} v VS ni zaželjena (Wiesak in sod., 2017).

V študiji Wiesak in sodelavcev postopek vitrifikacije ni vplival na ekspresijo gena FST v govejih jajčnih celicah. Znano je, da bi lahko FST bil pokazatelj kvalitete jajčne celice, saj je zmanjšano število transkriptov FST v govejih jajčnih celicah povezano s slabšo razvojno kompetenco zarodkov. Študije funkcionalne genomike, ki so kot model uporabljale govedo, so pokazale porast transkriptov FST v kvalitetnih jajčnih celicah v primerjavi s slabšimi jajčnimi celicami. Folistatin (FST) v jajčni celici je funkcionalno potreben za zgodnjo embriogenezo. Povečana količina FST mRNA v zrelih jajčnih celicah, vitrificiranih s Ca^{2+} , bi lahko bila posledica prisotnosti Ca^{2+} , ki je univerzalni sekundarni prenašalec v celicah in nadzira različne celične procese pri transkripcijski aktivaciji genov. Dokazali so tudi, da v IVM jajčnih celicah slabše kvalitete pride do porasta aktivnosti CTSB. Inhibicija CTSB med IVM in kulturo *in vitro* običajno poveča kvaliteto in razvojne kompetence govejih zarodkov, najverjetneje z zaviranjem nepotrebne proteolize ali signalnih poti, ki vodijo v apoptozo. Wiesak in sodelavci niso opazili nobenih sprememb v količini mRNA CTSB v zrelih in nezrelih jajčnih celicah ter v nivoju transkriptov za gene, ki so vključeni v apoptozo po vitrifikaciji govejih jajčnih celic v različnih fazah zorenja. Prisotnost Ca^{2+} v VS je povečala nivo mRNA

CTSB v nezrelih jajčnih celicah precej bolj kot pa pri zrelih. Prisotnost Ca^{2+} v VS lahko okrepi že začete degenerativne procese v jajčni celici, če le-te niso dosegle MII faze v določenem časovnem okviru tako kot ostale jajčne celice v gojišču.

2.4.4 Vpliv vitrifikacije na zono pelucido

Wiesak in sodelavci so odkrili, da vitrifikacija in prisotnost Ca^{2+} ne vplivata na debelino ZP in premer preživelih jajčnih celic. Sproži pa vitrifikacija otrdevanje ZP v jajčnih celicah in tako je bil v mišjih jajčnih celicah, ki so jih vitrificirali ob prisotnosti Ca^{2+} , potreben šestkrat daljši čas za razgradnjo ZP s kimotripsinom kot v nevitrificiranih kontrolnih jajčnih celicah. Tudi pri govejih devitrificiranih jajčnih celicah so Wiesak in sodelavci potrebovali bistveno več časa za razgradnjo ZP kot pri svežih. Vitrifikacija pa je povečala otrdevanje ZP tudi v govejih IVM jajčnih celicah. Učinek otrdevanja ZP po krioprezervaciji so dokazali tudi pri miših, ljudeh in ovcah. Predvidevajo, da se tekom vitrifikacije jajčne celice umetno aktivirajo, ko se v citoplazmo sprostijo CG in se njihova vsebina spoji s plastmi ZP še pred dejansko oploditvijo, ki sicer sproži otrdevanje ZP. Pojav otrdevanja ZP bi lahko bil povezan z aktivnostjo krioprotektantov. Dimetil sulfoksid (DMSO) inducira sproščanje Ca^{2+} iz notranjih celičnih zalog (endoplazemski retikulum), medtem ko EG povzroča tok Ca^{2+} preko celične membrane iz zunanjega medija. Ker je količina Ca^{2+} , sproščenega v odgovor na DMSO podobna tisti ob oploditvi, najverjetneje sproži eksocitozo CG in otrdevanje ZP. Tudi pri podganjih jajčnih celicah so dokazali, da je otrdevanje ZP po vitrifikaciji posledica eksocitoze CG, do katere pride zaradi intracelularnega porasta Ca^{2+} v jajčni celici. V študiji Wiesak in sodelavcev je bilo otrdevanje ZP še toliko bolj izrazito ob uporabi VS, ki so vsebovale Ca^{2+} in je posledično prišlo do bistveno nižje stopnje delitev. Podobni rezultati so bili tudi pri mišjih in ovčjih jajčnih celicah (Wiesak in sod., 2017).

Choi in sodelavci so odkrili, da nepoškodovana ZP bistveno izboljša post-vitrifikacijsko preživetje jajčnih celic in sicer za približno 80%, v primerjavi z jajčnimi celicami brez ZP. Te rezultati kažejo na dolgoročno, funkcionalno preživetje jajčnih celic z nepoškodovano ZP po vitrifikacijskem postopku. Pri raziskavi ni bilo bistvene razlike v embrionalnem razvoju med svežimi in krioprezerviranimi jajčnimi celicami z ZP po IVF. Po vitrifikaciji mrtvih jajčnih celic z ZP se celokupna velikost ni spremenila, čeprav je bila citoplazma poškodovana (homogenizirana), kar kaže na močne mehanske značilnosti ZP pri preprečevanju morebitnih mehanskih poškodb zaradi nastanka ledu med krioprezervacijo. Analize s posebno mikroskopijo so pokazale, da imajo intaktne jajčne celice z ZP elastični modul, ki je bistveno višji kot pri jajčnih celicah brez ZP. Ta mehanska moč ZP prispeva k zaščiti jajčnih celic med vitrifikacijo, hkrati pa zmanjša verjetnost za nastanek mehanskega stresa kot je nastanek ledu med postopkom vitrifikacije in devitrifikacije. Ta študija tako, poleg že prej objavljenih bioloških funkcij, razkriva nove pomembne biološke naloge ZP pri zaščiti jajčnih celic med

vitifikacijo, glede na njene močne mehanske lastnosti v primerjavi s celično membrano jajčnih celic (Choi in sod., 2017).

2.4.5 Vpliv vitrifikacije na epigenetiko jajčne celice

Epigenetika se nanaša na določene dedne modifikacije, ki se pojavljajo v DNA ali kromosomih kot so npr. metilacija, modifikacije histonov in genomski imprinting, brez spreminjanja DNA zaporedja. Izbris in ponovno vzpostavljanje teh epigenetskih markerjev med razvojem sesalcev se imenuje epigenetsko reprogramiranje. Epigenetsko reprogramiranje je lahko dovzetno za vplive iz zunanjega okolja. Chen in sodelavci so sklepali, da ima lahko vitrifikacija jajčnih celic kot močan stresni dejavnik močne učinke na epigenetsko reprogramiranje tekom zgodnjega embrionalnega razvoja, kar ima za posledico zmanjšan razvojni potencial (Chen in sod., 2016).

Vitrificirane jajčne celice imajo še vedno zmanjšan razvojni potencial v primerjavi s svežimi jajčnimi celicami, kar lahko delno razložimo s porušeni celičnimi strukturami kot sta npr. celični skelet in delitveno vreteno, ki jih povzroči vitrifikacija. Visoka stopnja delitev vitrificiranih jajčnih celic odraža verodostojno učinkovitost vitrifikacije jajčnih celic. Stopnja formacije blastocist po oploditvi je bila v skupini vitrificiranih jajčnih celic še vedno bistveno nižja kot v kontrolni skupini. Sklepamo lahko, da so jajčne celice sicer imele zakasnen razvoj, čeprav to ni bistveno vplivalo na celične delitve. Zarodki, ki so se delili, so imeli slabši potencial za razvoj do blastociste, kar so odkrili tudi pri pronuklearni vitrifikaciji pri mačkah. To je najverjetneje povezano z nepričakovanimi spremembami ključnih razvojnih dogodkov tekom embrionalnega razvoja, kot je npr. epigenetsko reprogramiranje. Tekom *in vitro* gojenja normalno oplojenih govejih zarodkov se celokupna metilacija DNA postopno zmanjšuje do 8-celičnega stadija in zatem narašča do razvojne stopnje blastociste. Raziskava Chen in sodelavcev je pokazala tudi analogne spremembe v metilaciji DNA. Metilacija DNA je bila po vitrifikaciji bistveno manjša v jajčnih celicah in tudi nekajceličnih zarodkih. Celokupna metilacija v govejih MII jajčnih celicah se je bistveno zmanjšala po vitrifikaciji z EG in DMSO kot krioprotektantom. Tudi pri miših je metilacija DNA bistveno manjša v vitrificiranih MII jajčnih celicah in 2 do 8-celičnih zarodkih v primerjavi s kontrolo. V raziskavi ni bilo opaženo zmanjšano izražanje DNMT1, zato je za manj obsežno metilacijo verjetno odgovoren kakšen drug aktivni mehanizem, kar pa je potrebno še dodatno raziskati. Prav tako je bila do določene mere zmanjšana tudi DNA metilacija v blastocistah, ki so se razvile iz vitrificiranih jajčnih celic. Zmanjšan nivo DNA metilacije v trofoblastu (TE) najverjetneje vodi v nenormalno vzdrževanje imprintinga in razvoj posteljice. De novo encim za metilacijo DNA – DNMT3A, je bil bistveno manj izražen v blastocistah, ki so se razvile iz vitrificiranih jajčnih celic. Tudi vitrifikacija mišjih jajčnih celicah vodi do zmanjšanja ekspresije DNMT3b v blastocistah. Pri ljudeh so zarodki slabše kvalitete in tisti po vitrifikaciji, imeli

zakasnjeno ekspresijo gena *DNMT3b*, ki je še eden izmed genov, odgovornih za remetilacijo blastociste pred implantacijo. Izgleda, da vitrifikacija vedno vodi v zmanjšanje metilacije DNA v jajčnih celicah in zarodkih, kar je verjetno povezano s slabšim embrionalnim razvojem in kvaliteto zarodkov, zaradi vitrifikacije (Chen in sod., 2016).

Chen in sodelavci niso zaznali acetilacije H3K9 v vitrificiranih in tudi v svežih jajčnih celicah. Se pa je acetilacija H3K9 pojavila v velikem obsegu takoj po prvi celični delitvi v obeh skupinah. Ta hiter pojav je verjetno povezan z manjšo aktivacijo genoma v zgodnjem zarodku. Nivo acetilacije H3K9 je bil bistveno večji v 2- in 4-celičnem zarodku, ki se je razvil iz vitrificirane jajčne celice v primerjavi s kontrolno skupino. To lahko delno razložimo z znatnim povečanjem acetil transferaz KAT2A in KAT2B v 2-celičnem zarodku, ki sta vključeni v ustvarjanje acetilacije H3K9. Ob razvoju v blastocisto po vitrifikaciji jajčne celice je bil nivo acetiliranih H3K9 v TE celicah znatno nižji kot v kontrolni skupini. To se je skladalo z rezultati, da je bila količina KAT2A v blastocistah po vitrifikaciji bistveno zmanjšana. Nenormalno povišana acetilacija histonov je bila povezana s slabšo kvaliteto jajčnih celic ali zarodkov, zato bi lahko bila povečana acetilacija H3K9 v 2- in 4-celičnem zarodku še eden izmed pokazateljev okvare zaradi vitrifikacije jajčnih celic (Chen in sod., 2016).

Tako pri miših kot pri govedu, se H3K9 demetilacija pojavi v 2-celičnem zarodku, de novo metilacija pa se vzpostavi pred samo vgnezditevijo zarodka. Na podlagi študije Chen-a in sodelavcev obstaja tudi variacija H3K9me3, vendar je najpomembnejše dejstvo, da se lahko nivo H3K9me3 po vitrifikaciji v jajčnih celicah, 2- in 4-celičnem zarodku, drastično zmanjša. Podobna represivna modifikacija kot H3K9me3, H3K9me2, je bila nižja v morfološko okrnjenih zarodkih, ki so nastali z metodo ICSI v primerjavi s kontrolno skupino zarodkov po klasičnem IVF. Vse te nepravilnosti so bile opažene v jajčnih celicah in zgodnjih zarodkih pred razvojno stopnjo blastociste in se lahko delno popravijo z določenimi mehanizmi v fazah zgodnjih delitev zarodka, saj so epigenetske nepravilnosti skoraj izginile ob razvoju v blastocisto. Sklepamo lahko, da so zarodki, ki so se razvili v blastocisto po vitrifikaciji jajčnih celic, mogoče aktivno prilagodili njihovo nenormalno epigenetiko in tako končno bili sposobni iti skozi faze zgodnjih celičnih delitev (Chen in sod., 2016).

Rezultati Chen-a in sodelavcev so pokazali, da se po vitrifikaciji ekspresija genov *PEG10*, *XIST* in *KCNQ1O1T* poveča. Kot se je pokazalo pri vitrifikaciji mišjih jajčnih celic, je bila stopnja DNA metilacije zmanjšana pri genih *H19*, *Peg3* in *Snrpn* v različnih metilacijskih regijah v blastocisti, kar je bilo sprva posledica zmanjšane ekspresije DNMT. V dotični študiji je bila v blastociti po vitrifikaciji bistveno zmanjšana izraženost DNMT3A. Če povzamemo, je genomski imprinting precej občutljiv na vitrifikacijo jajčnih celic. Vitrifikacija jajčnih celic tako lahko vodi k številnim vplivom na normalno epigenetiko v jajčnih celicah in zgodnjih zarodkih.

Nenormalna epigenetika lahko pripomore k zmanjšanemu potencialu za razvoj zarodka po vitrifikaciji jajčne celice (Chen in sod., 2016).

2.4.6 Vplivi vitrifikacije na uspešnost oploditve

Cobo in sodelavci so opazili statistično značilne razlike v povprečni starosti ženske, številu jajčnih celic, deležu pacientk, ki so se ponovno vrnile na naslednji postopek IVF in kliničnih izidih. Preživetje jajčnih celic je večje v skupini žensk, ki so bile ob postopku vitrifikacije mlajše. Tudi stopnja živih rojstev na pacientko je statistično višja pri mlajših ženskah v primerjavi s starejšimi. V mlajši starostni skupini so lahko dobili več jajčnih celic, ki so jih nato vitrificirali in stopnja preživetja ter klinična ocena celic je bila enaka tisti v programu shranjevanja doniranih jajčnih celic, z najvišjim nivojem uspešnosti v najmlajši skupini žensk (do 29 let). Očiten je torej močan vpliv starosti ženske, saj iz biološkega stališča jajčne celice mlajših pacientk zagotavljajo večjo možnost uspeha (Cobo in sod., 2016). Vpliv starosti jajčnih celic na rezultate so dokazali tudi Nagy in sodelavci, ki so prišli tudi do rezultatov, da dajo vitrificirane jajčne celice celo boljše rezultate po IVF kot počasi zamrznjene jajčne celice in so ti rezultati primerljivi tistim s svežimi jajčnimi celicami. Podatki o rojstvih iz krioprezerviranih jajčnih celic so pokazali 1,3% incidenco razvojnih nepravilnosti ob rojstvu, kar je primerljivo z naravno spočetimi novorojenčki (Nagy in sod., 2017).

Sun in sodelavci so dobili zelo podobne stopnje oploditve in delitve celic tako v skupini svežih kot v skupini devitificiranih jajčnih celic, ki so dozorele *in vitro*. Razlike so se pokazale v nadaljnjem razvoju zarodka. Število primernih zarodkov z dobro kakovostjo je bilo na tretji dan mnogo nižje v skupini devitificiranih jajčnih celic, kot pa v skupini svežih jajčnih celic. Zaključili so, da je bil zmanjšan potencial za razvoj zarodka posledica zlasti počasnejšega razvoja do 3. dne gojenja. Razmerje med številom zarodkov, ki so se razvili do blastociste in številom vseh zarodkov na tretji dan je bilo podobno med obema, kar pomeni, da so imeli zarodki, ki so se uspešno razvili do tretjega dne, enak potencial za razvoj v blastocisto. Iz vidika kromosomskih nepravilnosti med skupinama ni bilo razlik (Sun in sod., 2015).

Na oploditev negativno vpliva tudi otrdevanje ZP, zato za oploditev devitificiranih jajčnih celic pogosto uporabljajo metodo ICSI. Znano je namreč, da otrdela ZP ovira vstop spermija v jajčno celico in posledično vpliva na oploditev, kar se odraža tudi v nižji stopnji celičnih delitev (Wiesak in sod., 2017).

2.5 IN VITRO ZORENJE JAJČNIH CELIC

In vitro zorenje (IVM) je zorenje jajčnih celic iz antralnih foliklov, ki so bile odstranjene iz jajčnikov v zgodnji do srednji folikularni fazi ženske v postopku IVF. V

naravnem procesu zorenja jajčne celice so ključne celice kumulusa in žarkaste korone, ki obdajajo jajčno celico in ob spodbudi hormonov in rastnih faktorjev, kakršnen je npr. epidermalni rastni faktor (EGF), izločajo mejozoaktivirajoče sterole (MAS), ki omogočajo normalno dozorevanje jajčne celice (Virant-Klun in sod., 2002). Prva poročila o rojstvu otrok, ki so se razvili iz IVM jajčnih celic so objavili v 90. letih. Sprva so jajčne celice dobivali pri postopku ooforektomije ali pri carskem rezu, kasneje pa se je kot učinkovitejša izkazala transvaginalna aspiracija foliklov ob uporabi ultrazvočne sonde (Čížek-Sajko in sod., 2007).

Metoda IVM je vse bolj uveljavljen postopek za zdravljenje neplodnosti pri človeku. Ta metoda največ obeta predvsem ženskam s PCOS, uporabljamo pa jo lahko tudi v normalnem ciklusu oploditve z biomedicinsko pomočjo, kjer dobimo zrele in pogosto tudi nekaj nezrelih jajčnih celic (Čížek-Sajko in sod., 2007). Nezrele jajčne celice inkubiramo v običajnem gojišču za gamete, z dodanimi hormoni FSH, LH in HCG. Gojišču dodamo kokulturo celic kumulusa, ki smo jih izolirali iz aspiratov iste bolnice. Kokultura se hitro prime na podlago in z izločanjem MAS ustvari ugodno okolje za dokončanje mejoze. Zarodke, ki se razvijejo, zamrzujemo ter opravimo prenos zarodkov v maternico v enem od kasnejših postopkov IVF (Virant-Klun in sod., 2002). Z IVM nezrelih jajčnih celic lahko tako izboljšamo uspešnost zunajtelesne oploditve v običajnem ciklusu (Čížek-Sajko in sod., 2007).

2.5.1 Uspešnost metode zorenja *in vitro*

Čížek-Sajko in sodelavci so se odločili za primerjavo dveh protokolov za IVM: hormonsko spodbujanje jajčnikov s FSH in hormonsko stimulacijo s HCG, spremljali pa so tudi rezultate pri ženskah z normalnimi ciklusi, kjer niso uporabili hormonskega spodbujanja jajčnikov temveč naravni ciklus. Raziskava je pokazala, da je metoda IVM uspešnejša pri ženskah s PCOS v primerjavi z ženskami z normalno delujočimi jajčniki, kar je lahko povezano z manjšim številom pridobljenih nezrelih jajčnih celic pri ženskah z normalnim ciklusom. Pokazalo se je, da lahko pri hormonski stimulaciji s HCG pričakujemo zarodke boljše kakovosti kot pri spodbujanju s FSH. Sklepali so, da spodbujanje s HCG verjetno zagotavlja ustrežnejšo citoplazemsko zorenje, kakovost jajčne celice pa je odvisna predvsem od zrelosti njene citoplazme. Verjetno je tako spodbujanje s HCG pri ženskah s PCOS sprožilo zadnje faze jedrnega in citoplazemskega zorenja jajčne celice, ki je sicer pri teh bolnicah okrnjeno (Čížek-Sajko in sod., 2007).

Uspešnost postopka IVM je odvisna tudi od gojišča za zorenje in časa zorenja, ki ga namenimo jajčnim celicam. Nezrele jajčne celice so po 24-30 urah gojenja v razmerah *in vitro* pri vseh treh skupinah žensk, ki so bile vključene v raziskavo, dozorele v podobnem odstotku. Po izkušnjah Čížek-Sajko in sodelavcev imajo jajčne celice, ki

dozorijo šele po 48 urah slabše možnosti za oploditev in zmanjšano sposobnost za nadaljnji razvoj v zarodke. Sposobnost oploditve se med tremi skupinami preiskovank ni bistveno razlikovala, se je pa pri ženskah s hormonsko stimulacijo s HCG več jajčnih celic razvilo v zarodke z bistveno manj večjedrnimi blastomerami, kar kaže na boljšo kakovost zarodkov. Večjedrnost je namreč pogosto povezana z večjo fragmentacijo blastomer, s slabšim razvojem in ugnездitvijo zarodkov, zastojem v razvoju in pogostejšimi aneuploidijami (Čížek-Sajko in sod., 2007).

2.5.2 Vpliv zorenja *in vitro* na jajčno celico

Uporaba IVM pri človeku je še vedno omejena, saj lahko poveča možnosti za aneuploidijo, kar vodi v tveganje za splav ali genetske bolezni. Skupina Franciosi in sodelavcev so opazili, da so IVM konjske jajčne celice bolj nagnjene k napakam v kromosomski segregaciji med MI razvojno stopnjo v primerjavi z *in vivo* zorjenimi jajčnimi celicami. To kaže na to, da aneuploidije lahko izhajajo iz MI razvojne stopnje, kar so podobno opisali tudi pri ljudeh. Pojavnost aneuploidij, ki so jih opazili v IVM jajčnih celicah konj je višja kot pri *in vitro* ustvarjenih zarodkih, zato lahko sklepamo, da nekatere aneuploidije niso kompatibilne z zgodnjim razvojem zarodka (Franciosi in sod., 2015).

Večina napak v kromosomski segregaciji, ki imajo za posledico aneuploidijo, izhaja iz MI razvojne stopnje jajčnih celic. Različne raziskovalne skupine so predlagale različne genetske, epigenetske in biokemijske mehanizme, ki bi lahko bili razlog za kromosomske nepravilnosti pri ločevanju genetskega materiala. Aneuploidije so torej multifaktorske in izhajajo iz različnih mehanizmov (Franciosi in sod., 2015).

V raziskavi Franciosi in sodelavcev so imele IVM konjske jajčne celice večji odstotek aneuploidij v primerjavi z *in vivo* zorjenimi jajčnimi celicami. Petdeset odstotkov IVM jajčnih celic je pokazalo očitne morfološke nepravilnosti, kot npr. multipolarno ali monopolarno delitveno vreteno in kromosome, razpršene preko strukture delitvenega vretena, medtem ko so vse *in vivo* dozorjene jajčne celice imele bipolarno delitveno vreteno s kromosomi poravnanimi v metafazni ravnini. Struktura delitvenega vretena je bila v jajčnih celicah po IVM manj kompaktna kot v *in vivo* zorjenih jajčnih celicah. *In vitro* zorjene (IVM) jajčne celice so imele bistveno večji premer in razdaljo med poloma (dolžina delitvenega vretena) kot *in vivo* zorjene jajčne celice. Globalna acetilacija H4K16 je bila bistveno manjša v IVM jajčnih celicah v primerjavi z *in vivo* zorjeno skupino jajčnih celic, medtem ko so ostanki K8 in K12 ostali nespremenjeni. Franciosi in sodelavci niso opazili bistvene razlike v ekspresiji genov *HAT1*, *KAT8*, *HDAC1* in *SIRT1* med tremi skupinami jajčnih celic (IVM, *in vivo* maturirane in jajčne celice v fazi GV), neodvisno od faze mejoze ali zoritvenega stanja (Franciosi in sod., 2015).

Na mišjem modelu je dokazano, da je hiperacetilacija H4K16 povezana s šibkejšo povezavo med mikrotubuli in kinetohorjem in povečanim številom napak pri segregaciji kromosomov. Tudi študija Franciosi in sodelavcev podpira dejstvo, da je normalno stanje acetilacije povezano z ustrezno segregacijo kromosomov in vzpostavitvijo delitvenega vretena. Med zorenjem jajčne celice je kromatin transkripcijsko neaktiven, nadzor genske ekspresije pa se vrši na citoplazemskem nivoju z regulacijo translacije, shranjevanja in razgradnje specifičnih transkriptov. Iz tega vidika Franciosi in sodelavci sklepajo, da IVM vpliva na tovrstne regulatorne mehanizme, npr. s spodbujanjem razgradnje mRNA vključene v histonsko acetilacijo ali inhibicijo razgradnje transkriptov deacetilaze (Franciosi in sod., 2015).

2.6 FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA IN IMUNOLOKALIZACIJA

Imunofluorescenca je pogosta tehnika, ki jo izvajamo s fluorescenčnim mikroskopom v laboratorijih in institucijah, ki se ukvarjajo z biološkimi znanostmi. Znanstvenikom omogoča enostavno identifikacijo in diferenciacijo s protitelesi in antigeni, ki so prisotni v vzorcih tkiva (Microscopemaster, Immunofluorescence microscopy).

Imunofluorescenčna tehnika uporablja fluorescenčna barvila (fluorokrome), ki privlačijo in se vežejo na specifična protitelesa, ki jih proizvaja imunski sistem (Microscopemaster, Immunofluorescence microscopy). V imunolokalizaciji se uporabljajo zlasti fluorokromi, ki za vezavo na specifično tarčo potrebujejo molekule kot so protitelesa ali lektini. Večina teh se prodaja skupaj s specifičnimi tarčnimi molekulami (Imaging and microscopy, 2005).

Fluorokrome lahko preko protiteles uporabljamo tudi za identifikacijo razporeditve specifičnih proteinov v tkivu (imunohistokemija). Značilnost fluorokromov pa so tudi različne spektralne lastnosti, zato jih lahko kombiniramo za večbarvne analize vzorcev (Imaging and microscopy, 2005). Metoda imunofluorescence se lahko uporablja tako za fiksirane kot sveže vzorce, kar omogoča bolj raznolike analize in natančnejše rezultate (Microscopemaster, Immunofluorescence microscopy).

Pri imunofluorescenci ločimo dva pristopa – direktnega in indirektnega. Direktni pristop je redkeje uporabljena metoda, ki vključuje direktno obarvanje specifičnih protiteles, ki se vežejo na specifičen antigen, ki nas zanima. Je manj ugodna metoda in za seboj potegne visoke stroške, je manj fleksibilna in ima slabši signal. Pozitivna lastnost je, da je časovno manj potratna (manj čakanja za nanos in sušenje raztopin) in je preprostejša za označevanje.

Indirektni pristop je kompleksnejša metoda, ki zahteva sekundarna protitelesa, ki vežejo fluorescenčno barvilo na primarno protitelo ali na specifičen antigen, ki nas zanima. Sam proces je zelo občutljiv, vendar dobimo boljše rezultate, kot pri direktnem

barvanju. Pri označevanju s sekundarnimi protitelesi, se lahko na eno primarno protitelo veže več sekundarnih protiteles s fluorokromi zato je signal oz. fluorescenca bistveno intenzivnejša. Indirektno označevanje je tudi cenejše in omogoča boljše kvaliteto kontrole. Indirektni pristop ima tudi svoje negativne plati kot so npr. nekompatibilnost ali slaba reakcija med sekundarnimi in primarnimi protitelesi ali antigenom. Testiranje večih vzorcev in oznak lahko postane naporno in časovno potratno, raziskovalec pa mora uporabiti različne izotope primarnih protiteles, pridobljenih iz različnih živali, da se izogne navzkrižnim reakcijam in pridobi čimbolj natančne rezultate (Microscopemaster, Immunofluorescence microscopy).

Slabost fluorescenčne mikroskopije je tudi neobstočnost fluorokromov. Z opazovanjem preparatov pride do bledenja pigmentov in fluorescenca zbledi. Vzorce, ki jih označimo s protitelesi morajo biti kemijsko fiksirani in celice pogosto potrebujejo obdelavo z detergentom za permeabilizacijo celičnih membran. Oba slednja postopka lahko privedeta do artefaktov (Wilson in Bacic, 2012).

Poleg lokalizacije s protitelesi lahko pri fluorescenčni mikroskopiji strukture in molekule lokaliziramo še na druge načine. Pri fluorescenčni mikroskopiji lahko uporabimo fluorokrome, ki imajo vezavne kapacitete sami po sebi, kot npr. DAPI za nukleinske kisline. V to skupino spadajo tudi fluorokromi, ki spremenijo svoje fluorescentne lastnosti, ko se vežejo na različne molekule (npr. Ca^{2+}). Ti fluorokromi se torej uporabljajo direktno in ne potrebujejo transportnega sistema kot je npr. protitelo (Imaging and microscopy, 2005).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 PRIDOBITEV HUMANIH JAJČNIH CELIC

Delo je potekalo v okviru raziskovalnega projekta, ki ga je odobrila Komisija za medicinsko etiko (Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije (RS); KME 115/04/16, 2016 – Priloga A).

Za pridobitev jajčnih celic je najprej potrebna hormonska hiperstimulacija jajčnikov, ki poteka po enem izmed sledečih protokolov. Namen te stimulacije je, da zavremo naravno delovanje jajčnikov in nato s hormoni, ki jih apliciramo pacientki, umetno reguliramo delovanje jajčnikov. V naravi dozori povprečno en folikel/jajčna celica na menstrualni cikel, mi pa s hormoni dosežemo super-ovulacijo, da v obeh jajčnikih dozori več foliklov in dobimo povprečno 6-7 jajčnih celic na pacientko. Stimulaciji sledi odvzem jajčnih celic iz foliklov z ultrazvočno aspiracijo.

3.1.1 Protokol hormonske hiperstimulacije jajčnikov z antagonisti GnRH

V tej skupini je bil začetni dnevni odmerek 200–250 IU rekombinantnega FSH (rFSH) (follitropin alfa, Gonal F Merck Serono ali follitropin beta, Puregon MSD), z odmerjanjem pa smo začeli na drugi dan menstrualnega cikla. Ženske so prejele odmerek 0,25 mg GnRH antagonista cetrotrelis acetata (Cetrotide; Asta Medica AG, Frankfurt, Nemčija) na dan in sicer od dneva, ko je dominantni folikel dosegel premer \leq 14 mm, pa do dneva začetka dodajanja HCG. V času stimulacije smo dnevni odmerek rFSH prilagajali individualno.

3.1.2 Protokol hormonske hiperstimulacije jajčnikov z blagimi antagonisti GnRH

V tej skupini je bil začetni dnevni odmerek 200–225 IU rFSH (follitropin alfa, Gonal F Merck Serono ali follitropin beta, Puregon MSD), z odmerjanjem pa smo začeli peti dan menstrualnega cikla. Ženske so dobile 0,25 mg GnRH antagonista cetrotrelis acetata (Cetrotide; Asta Medica AG, Frankfurt, Nemčija) na dan in sicer od dneva, ko je dominantni folikel dosegel premer \leq 14mm, pa do dneva začetka dodajanja HCG.

3.1.3 Protokol hormonske hiperstimulacije jajčnikov z agonisti GnRH

V tej skupini smo stimulacijo ovarijev izvajali z analogi GnRH (Suprefact; Hoechst AG, Frankfurt/Main, Nemčija) od 22. dneva menstrualnega cikla, dnevni odmerek pa je znašal 0,6 mL (600 pg). Po 14 dneh smo preverili desenzibilizacijo hipofize z določitvijo E_2 in B – načinom ultrazvočnega skeniranja. Ko smo dosegli pogoje za desenzitivizacijo ($E_2 \leq 0,05$ nmol/L, premer foliklov ≤ 5 mm in debelina endometrija \leq

5 mm), smo začeli s stimulacijo jajčnikov z dnevnim odmerkom 200–225 IU rFSH (follitropin alfa, Gonal F Merck Serono ali follitropin beta, Puregon MSD). Dodajanje GnRH smo nadaljevali do dodajanja HCG. Kasneje v obdobju stimulacije smo dnevni odmerek rFSH prilagajali posameznicam.

V vseh treh skupinah, smo pričeli z dajanjem HCG (Pregnyl; N.V. Organon, Oss, Nizozemska) v odmerku 10.000 IU, ko so trije ali več foliklov dosegli premer 18 mm. Odvzem jajčnih celic pri vseh skupinah smo izvedli 36 ur po začetku dajanja HCG (Štimpfel in sod., 2015).

3.2 VITRIFIKACIJA HUMANIH JAJČNIH CELIC S CRYOTOP POSTOPKOM

Vitrifikacija je potekala v Laboratoriju za oploditev z biomedicinsko pomočjo (OBMP) Viale z BS medijem (osnovno raztopino), ES medijem (ekvilibracijsko raztopino) in VS medijem smo vsaj pol ure pred vitrifikacijo postavili na sobno temperaturo, da so se segrele. Pri sobni temperaturi je potekal tudi celoten postopek vitrifikacije. Pomembno je, da s potrebnimi podatki označimo nosilec Cryotop oz. nanj nalepimo nalepko s podatki. V Reproplate posodico smo dali medije, segrete na sobno temperaturo – v prvo luknjo 20 μ l BS medija, v drugo in tretjo pa 300 μ l VS medija.

Nato smo prenesli največ 4 jajčne celice na dno BS medija z minimalnim volumnom predhodnega gojišča. Za prenos jajčnih celic smo uporabili običajno denudacijsko pipeto s premerom 0,134–0,145 mm (Vitrolife). Nato smo jajčnim celicam v BS mediju dodali 20 μ l ES medija, tako da smo zaokrožili po luknji ob robu BS medija in jajčne celice pustili inkubirati 3 minute. Dodali smo 20 μ l ES medija, ponovno tako, da smo zaokrožili po luknji in pustili inkubirati nadaljne 3 minute. V naslednjem koraku smo z istim krožnim gibom dodali 240 μ l ES medija in pustili inkubirati 6 do največ 9 minut. Čas inkubacije prilagodimo glede na to, kako hitro se jajčne celice ekvilibrirajo. Jajčne celice so popolnoma ekvilibrirane, ko je širina PVS enaka kot pred začetkom vitrifikacije. Nato smo jajčne celice z minimalnim volumnom prenesli na vrh prve kapljice VS medija. Zatem smo iz pipete izpihali ES medij, tako da ni prišel v VS medij in sprali pipeto z VS medijem. Nato smo jajčne celice vsaj trikrat premaknili znotraj VS kapljice, tako da so se dobro sprale v VS mediju. V prvi kapljici VS medija smo jajčne celice pustili 30 sekund.

Iz prve kapljice VS medija smo nato prenesli jajčne celice v drugo kapljico svežega VS medija z minimalnim volumnom. Iz pipete smo izpihali VS medij iz prejšnje kapljice, da ni prišel v svežo kapljico in pipeto sprali s svežim VS medijem. Znotraj kapljice VS medija smo jajčne celice dvakrat prestavili in jih po 20–30 sekundah prenesli na Cryotop v bližino črne oznake, tako, da je okoli jajčnih celic ostal minimalen volumen VS medija.

Cryotop smo nato potopili direktno v tekoči dušik. Od prenosa jajčnih celic iz druge kapljice VS medija do potopitve v tekoči dušik (-196 °C) ne sme preteči več kot 20–30 sekund. Celoten čas od prenosa jajčnih celic v prvo kapljico VS medija do potopitve v tekoči dušik ne sme biti daljši od 80 sekund. Cryotop smo nato dali v zaščitno slamico in dobro zatesnili. Cryotop in slamica morata biti ves čas v tekočem dušiku – tudi pri vstavljanju v in iz kontejnerja. Slamico s Cryotopom lahko vzamemo iz tekočega dušika šele pri odmrzovanju.

3.3 DEVITRIFIKACIJA HUMANIH JAJČNIH CELIC

Za prenos jajčnih celic pri devitifikaciji smo uporabili običajno denudacijsko pipeto s premerom 0,134–0,145 mm (Vitrolife).

Sam postopek devitifikacije jajčnih celic se začne s pripravami medijev. Potrebno je bilo segreti 1 ml TS medija (raztopine za odmrzovanje) v inkubatorju na 37 °C v zaprti viali vsaj 1,5 ure pred uporabo. Viala mora biti zaprta, da ne pride do spremembe pH-ja medija. Sočasno smo segreti tudi NuncTM-Well Dish. Vsaj pol ure pred odmrzovanjem jajčnih celic, postavimo na sobno temperaturo še viali z DS medijem (redčitveno raztopino) in WS medijem (raztopino za spiranje).

Vsi mediji morajo biti segreti na sobno temperaturo, razen TS medija, ki mora biti segret na 37 °C. Pri sobni temperaturi poteka tudi celoten postopek odmrzovanja.

V petrijevki smo naredili kapljico DS medija in dve kapljici WS medija, ogretili na sobno temperaturo. Velikost kapljic je znašala od 100–150 µl. Posodo s tekočim dušikom, v katerem je Cryotop z jajčnimi celicami smo postavili v bližino stereolupe in razrahljali Cryotop in slamico do te mere, da smo lahko Cryotop z eno roko vzeli iz dušika.

Ogreto posodo NuncTM-Well Dish smo vzeli iz inkubatorja in v eno luknjo prelili 1 ml ogretega TS medija. Nato moramo čim hitreje potopiti Cryotop z jajčnimi celicami v TS medij – čas prenosa mora biti krajši od 1 sekunde. Eno minuto po potopitvi Cryotopa z jajčnimi celicami smo v TS medij aspirirali jajčne celice. Aspiracija je potrebna tudi v primeru, ko se jajčne celice še ne odlepijo iz Cryotopa. V primeru, ko se jajčne celice prej kot v 1 minuti odlepijo iz Cryotopa in priplavajo na vrh TS medija, jih aspiriramo s pipeto in prenesemo na dno kapljice. Po 1 minuti smo aspirirali jajčne celice s TS medijem, tako da so bile približno 2 mm od konca pipete.

Jajčne celice s TS medijem smo prenesli v kapljico DS medija, tako da smo na dno kapljice najprej spustili TS medij in na to osnovo odmrznjene jajčne celice. Inkubacija je potekala 3 minute pri sobni temperaturi. Sledilo je aspiriranje jajčnih celic z DS medijem približno 2 mm od konca pipete. Nato smo jih prenesli v prvo kapljico WS

medija, tako da smo na dno kapljice najprej spustili DS medij in na to osnovo zamrznjene jajčne celice. Inkubacija je potekala 5 minut pri sobni temperaturi.

Po inkubaciji smo jajčne celice aspirirali in z minimalnim volumnom medija prenesli na vrh druge kapljice WS medija. Ko so jajčne celice potonile na dno, smo jih aspirirali, ponovno prenesli na vrh kapljice in počakali, da so ponovno potonile na dno. Skupen čas inkubacije v drugi kapljici WS medija je bil 1 minuta.

Nato smo jajčne celice prenesli v predhodno, čez noč inkubiran Fertilization Medium (Cook, 37 °C, 6 % CO₂) ali v Univerzal IVF Medium (Origio).

3.4 *IN VITRO* ZORENJE HUMANIH JAJČNIH CELIC

In vitro zorenje jajčnih celic smo v Laboratoriju za OBMP izvajali po protokolu proizvajalca raztopin MediCult (Danska). Pri tem se uporablja MediCult IVM[®] System, Origio, Danska. Potrebna je bila predhodna stabilizacija jajčnih celic v 20 µl mikrokapljici LAG Medium (viala 1) in nato inkubacija v 60 µl IVM[®] Medium (viala 2) pod parafinskim oljem v CO₂-inkubatorju, to je okolju s 5–6 % koncentracijo CO₂, pri temperaturi 37 °C za najmanj 12 ur. Medij za zorenje IVM[®] Maturation Medium je sestavljen iz 9 ml IVM[®] Medium (viala 2), 1 ml lastnega seruma bolnice, 10 µl HCG raztopine (100 mIU/ml) ter 100 µl FSH raztopine (75 mIU/ml). Po odvzemu jajčnih celic iz jajčnikov smo shranili nezrele GV jajčne celice v LAG Medium v okolju s 5–6 % koncentracijo CO₂ pri temperaturi 37 °C za 2–3 ure. Sledil je prenos in inkubacija jajčnih celic v končnem mediju za zorenje IVM[®] Maturation Medium in sicer v CO₂-inkubatorju s 5–6% koncentracijo CO₂, pri temperaturi 37 °C za 28–32 ur. Jajčne celice so dozorele *in vitro*, če so pri tem sprostile polarno telo in s tem prešle v razvojno stopnjo MII.

3.5 POČASNO ZAMRZOVANJE IN ODMRZOVANJE JAJČNIH CELIC

S kliničnimi embriologi Laboratorija za OBMP smo izvedli počasno zamrzovanje in hitro odmrzovanje jajčnih celic po sledečem postopku po objavljeni metodi (Virant-Klun in sod., 2011). Prvih 15 minut smo jajčne celice inkubirali pri sobni temperaturi v raztopini I (1,5 M propandiol), celice smo nato prestavili v raztopino II (1,5 M propandiol, 0,3 M saharoza), kjer smo jih inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi. Potem smo jajčne celice aspirirali v plastične zamrzovalne slamice, ki smo jih zatalili. Sledilo je postopno programsko zamrzovanje jajčnih celic v posebnem aparatu (Air Liquide, Francija): od 20 °C do -8 °C smo jajčne celice ohlajali po 2 °C/minuto, sledilo je ohlajanje od -8 °C do -30 °C z ohlajanjem po 0,3 °C/minuto, na koncu pa še po 50 °C/minuto od -30 °C pa do -150 °C. Ohlajanje je potekalo v parah tekočega dušika. Pri -8 °C smo opravili ročni »seeding«; s kovinsko paličico, ohlajeno v tekočem dušiku smo

se dotaknili predela slamice z jajčnimi celicami in s tem umetno regulirali nastanek ledu oziroma kristalizacijo, da bi le-ta čim manj poškodovala celice. Zamrznjene jajčne celice smo shranili v tekočem dušiku.

Za odmrzovanje jajčnih celic slamice z jajčnimi celicami potegnemo iz tekočega dušika. Odmrzovanje jajčnih celic smo začeli s 5 minutno inkubacijo pri sobni temperaturi v raztopini 1 (1,5 M propandiol, 0,2 M saharoza), sledila je inkubacija v raztopini 2 (0,5 M propandiol, 0,2 M saharoza), ki je trajala 5 minut in je potekala pri sobni temperaturi. Tretja inkubacija je trajala 10 minut in je potekala pri sobni temperaturi v raztopini 3 (0,2 M saharoza). Končna inkubacija je potekala v raztopini 4 (Flushing medij, MediCult, Origio), najprej 10 minut pri sobni temperaturi, nato pa še 10 minut v CO₂ inkubatorju. Odmrzovanje jajčnih celic je bilo hitro (1 minuta), po inkubacijah v raztopinah pa smo jajčne celice prestavili v predhodno kalibriran in ogret IVF medij (Laboratorij za OBMP-Navodila za uporabo, 2013).

3.6 IMUNOCITOKEMIJA HUMANIH JAJČNIH CELIC

Humane jajčne celice smo fiksirali 10 minut v 4 % paraformaldehidu (PFA), nato smo jih dvakrat sprali v fosfatnem pufu (PBS). Sledila je 10 minutna permeabilizacija membran v 0,3 % Triton X-100, nato smo celice ponovno dvakrat sprali v PBS in jih inkubirali 20 minut v 10 % FBS. Nesprane jajčne celice smo nato prenesli v raztopino primarnih protiteles za FIGLO (Abcam, ab 173725; rabbit polyclonal antibodies against FIGLA; dilution 1:100) in inkubirali 60 minut. Po inkubaciji v primarnih protitelesih smo celice petkrat sprali v PBS in jih nato inkubirali 30 minut v sekundarnih protitelesih (Cy3 goat anti-rabbit IgG; Molecular Probes, A10520; dilution 1:200). Po končani inkubaciji smo celice prestavili v kapljico Vectashield mounting medija z DAPI barvilom (Vector Laboratories, H-1200) in jih inkubirali še do 15 minut. Vse faze inkubacije so potekale pri sobni temperaturi in v temi. Za negativno kontrolo smo v postopku izpustili inkubacijo v primarnih protitelesih.

3.7 OPAZOVANJE IZRAŽANJA TRANSKRIPCIJSKEGA FAKTORJA FIGLA V HUMANI JAJČNI CELICI S FLUORESCENČNO MIKROSKOPIJO

Fotografije smo zajeli z mikroskopom Nikon (Eclipse E600, Nikon, Japonska) opremljenega s kamero (Nikon DS-Fi1). Vse slike so bile fotografirane s fluorescenčno mikroskopijo in navadno svetlobno mikroskopijo. Pri fluorescenci smo uporabili filter za DAPI ter filter za rdečo fluorescenco (G2A). Kontrast smo izboljšali še s filtri ND4 (Neutral Density 4) in ND16 (Neutral Density 16). Zajete in shranjene originalne fotografije smo nato v programu Nis-F obdelali in združili. Za združevanje smo uporabili fotografijo, kjer je bil prikazan genetski material označen z DAPI ter

fotografije zajete s filtrom G2A. Pri filtru G2A za FIGLO smo zajeli 3 različne fotografije (samo G2A, G2A + ND4 in G2A + ND16). Za sestavljanje z Nikonovo programsko opremo Nis Elements, smo izbrali najbolj optimalno fotografijo posneto s filtrom G2A – tako, ki ni presvetla in še vedno dovolj dobro poudari bistvene dele celice ter prikaže izražanje FIGLA proteina. V večini primerov je bila to slika zajeta pri razmerah G2A + ND4. Sestavljenim slikam smo nato linearno prilagodili kontrast, tako da so celice čim bolj izstopale na ozadju.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

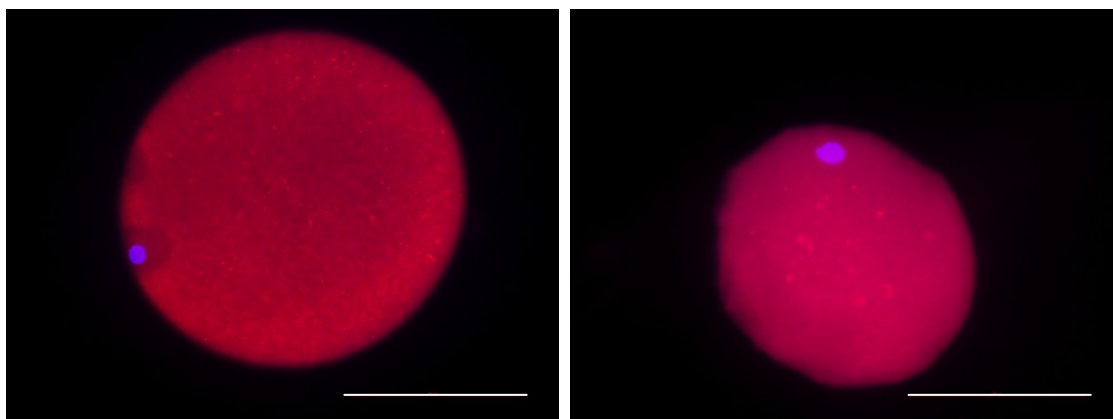
Vsi rezultati pridobljeni v tej nalogi so ocenjeni kvalitativno, predvsem glede na vzorec barvanja na protein FIGLA. Kvantifikacija v takih raziskavah je običajno zahtevnejša, saj so za kvantificiranje fluorescence potrebni posebni programi, ki nam niso bili na razpolago. V nekaterih primerih so opazne izrazite razlike v barvanju, zato lahko predpostavljamo, da je izražanje proteina drugačno. Zaradi visoke občutljivosti jajčnih celic človeka, ki v veliki meri ne preživijo imunocitokemičnega barvanja, so tovrstni rezultati v literaturi zelo redki. Tudi v tem delu smo imunocitokemično barvali večje število jajčnih celic, a se le relativno majhen delež jajčnih celic ni poškodoval. Opazili smo, da to ni bilo odvisno samo od metode barvanja, ki je agresivna, temveč tudi od same kakovosti jajčnih celic, ki je bila pri nekaterih ženskah slabša. Jajčne celice, prikazane v rezultatih so bile vse imunocitokemično barvane in opazovane s fluorescenčnim mikroskopom na enak način.

4.1 SVEŽE JAJČNE CELICE

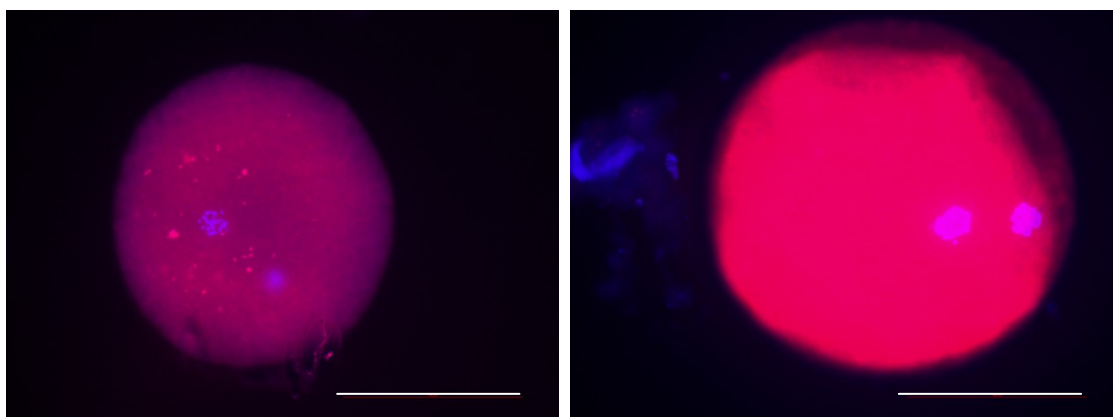
Imunocitokemično smo obarvali skupino svežih jajčnih celic, ki so bile nezrele in kot take brez naravne sposobnosti oploditve ali pa so bile zrele, a se niso oplodile v postopku IVF. Za izražanje proteina FIGLA je bilo značilno obarvanje na rdeče oziroma rdeča fluorescenca. Genetski material je bil obarvan z modro barvo (DAPI). Opazili smo heterogenost jajčnih celic glede na njihovo velikost, obliko, vzorec barvanja oziroma izražanja proteina in razporeditev genetskega materiala, kar bi lahko bila posledica dejstva, da smo uporabili jajčne celice, ki se niso oplodile po postopku IVF in bi zato lahko imele več nepravilnosti.

Pri nezrelih (profaza I) jajčnih celicah smo opazili modro obarvanje genetskega materiala v predelu jedra – GV, pri zrelih jajčnih celicah (MII) pa je bil genetski material modro obarvan na dveh različnih predelih: v jajčni celici in v polarnem telesu. Na nekaterih slikah so vidna tudi obarvana jedra semenčic pri jajčnih celicah, ki se niso oplodile po klasičnem postopku zunajtelesne oploditve z inseminacijo s spermiji, to je dodajanjem spermijev v gojišče z jajčno celico.

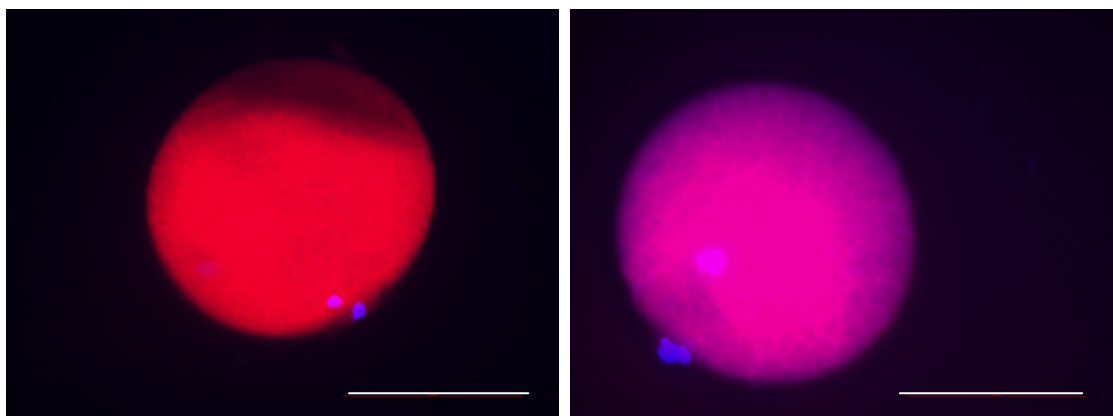
Opazili smo, da je bil protein FIGLA bolj ali manj razporejen po vsej citoplazmi jajčne celice in tudi v območju genetskega materiala, kot je razvidno iz Slik 8–12.



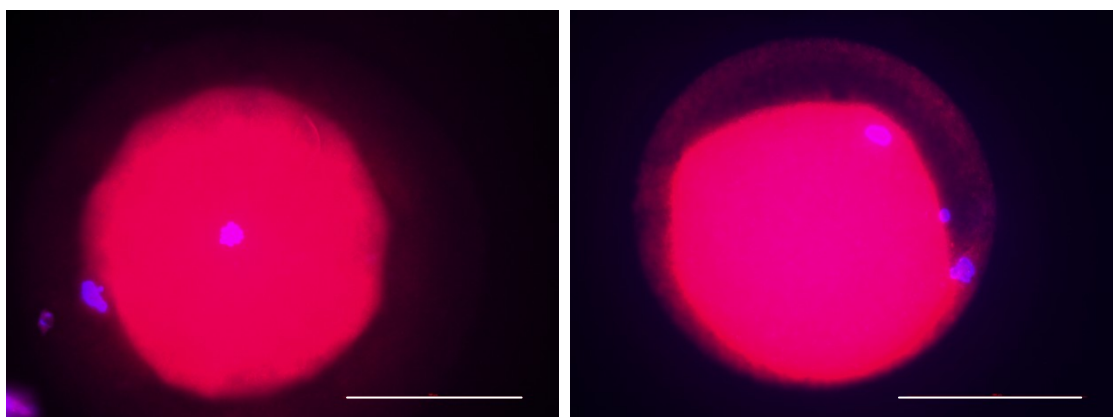
Slika 8: Dve sveži nezreli jajčni celici (levo in desno). Leva jajčna celica kaže atipično sliko genetskega materiala oziroma GV tik pod površino; v predelu genetskega materiala je protein FIGLA manj izražen. Na levi jajčni celici je protein FIGLA nekoliko bolj skoncentriran na periferiji jajčne celice, na desni jajčni celici pa lahko opazimo zrnca proteina tudi v centralnem delu jajčne celice.
Merilo (bela črta): 100 μ m.



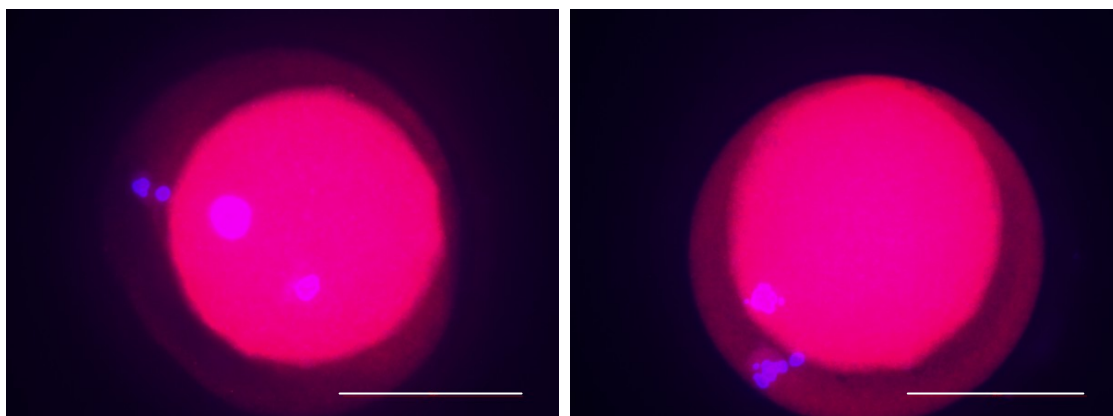
Slika 9: Dve sveži zreli jajčni celici (levo in desno). Pri obeh je videti modro obarvan genetski material na dveh delih: v jajčni celici in v polarnem telesu. V levi jajčni celici je bil protein manj izražen, tudi v zrnih. V desni jajčni celici je v celoti protein bolj izražen, vendar se periferno na dveh mestih opazi manjša izraženost proteina FIGLA, opazna pa je tudi delna izraženost proteina v ZP.
Merilo (bela črta): 100 μ m.



Slika 10: Sveži zreli jajčni celici (levo in desno). Pri obeh jajčnih celicah je protein FIGLA močno izražen in boljše skoncentriran v centralnem delu kot na obrobem. Merilo (bela črta): 100 μ m.



Slika 11: Dve sveži zreli jajčni celici (levo in desno). Pri obeh jajčnih celicah je protein FIGLA močno izražen. Pri levi jajčni celici opazimo nekoliko manjšo izraženost proteina FIGLA na obrobju. Pri desni jajčni celici opazimo rahlo izraženost proteina FIGLA tudi v ZP jajčne celice. Pri desni jajčni celici opazimo tudi modro obarvan genetski material v glavici semenčice. Merilo (bela črta): 100 μ m.



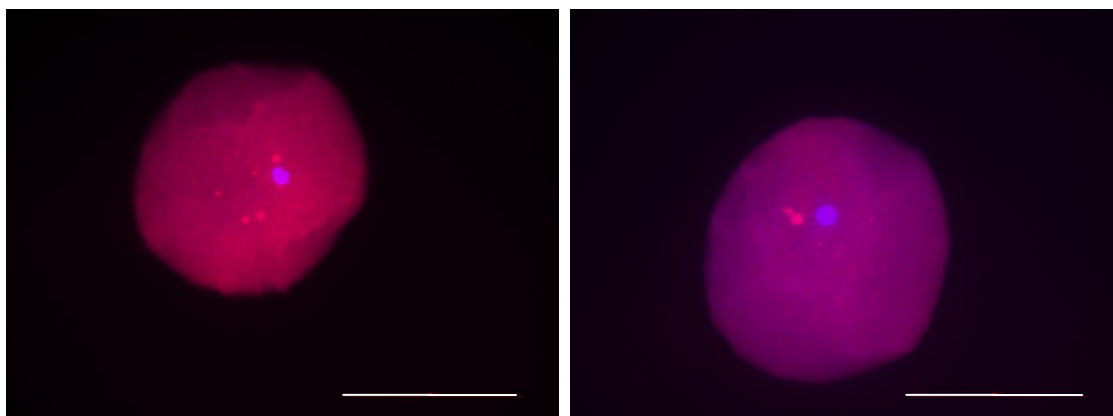
Slika 12: Dve sveži zreli jajčni celici (levo in desno). Pri obeh jajčnih celicah je protein FIGLA močno izražen, rahlo tudi v ZP. Pri obeh jajčnih celicah opazimo tudi modro obarvan genetski material v glavicah semenčic. Merilo (bela črta): 100 μm .

Iz fotografij lahko vidimo, da je izražanje proteina FIGLA pri svežih jajčnih celicah ponekod zrnato (Sliki 8 in 9) ne glede na zrelost jajčne celice, v večini pa bolj enakomerno oziroma zvezno. Protein se nahaja tako v citoplazmi kot tudi v ZP. Rahlo obarvanost ZP na protein FIGLA smo opazili samo pri zrelih jajčnih celicah (Sliki 11 in 12), ne pa pri nezrelih jajčnih celicah. Pri eni od nezrelih celic (Slika 8, nezrela sveža jajčna celica – levo) je izražanje proteina FIGLA v okolici jedra nekoliko manjše. V celotnem vzorcu lahko opazimo heterogeno izražanje proteina – nekje je bolj intenzivno na periferiji, nekje bolj v centralnem delu, v bližini jedra. Pri zrelih jajčnih celicah je opazna večja izraženost proteina FIGLA v centralnem delu, kjer je prisoten tudi genetski material jajčne celice, oziroma manjša izraženost proteina v obrobem delu (Slike 9-11), med tem ko smo pri nezrelih jajčnih celicah opazili rahlo koncentracijo proteina v perifernem delu.

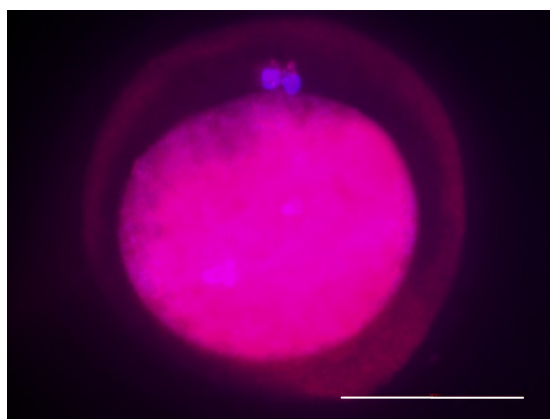
Vidimo lahko, da se je TF FIGLA izražal tudi v ZP, ki se je posledično lepo obarvala pri zrelih jajčnih celicah, pri nezrelih pa ne (kar je kasneje opazno tudi v skupini IVM jajčnih celic).

4.2 JAJČNE CELICE, DOZOREVANE *IN VITRO*

Imunocitokemično smo obarvali na protein FIGLA jajčne celice, ki so bile iz jajčnikov pridobljene kot nezrele jajčne celice z GV in smo jih dozorevali v razmerah *in vitro*: jajčne celice, ki kljub temu niso dozorele in sprostile polarnega telesa (Slika 13) in jajčne celice, ki so v postopku dozorele v MII stopnjo in pri tem sprostile polarno telo (Slika 14).



Slika 13: Dve nezreli jajčni celici, ki sta bili zorjeni *in vitro*, a nista dozoreli (levo in desno). Pri obeh lahko opazimo bolj koncentriran protein ob genetskem materialu v centralnem delu; protein je skoncentriran tudi v zrnkih, ki se pojavljajo v bližini genetskega materiala oziroma germinalnega vezikla. Merilo (bela črta): 100 μm .



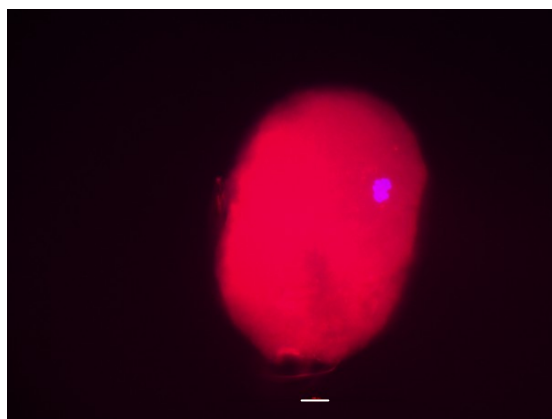
Slika 14: Zrela jajčna celica, ki je dozorela v postopku zorenja *in vitro*. Protein FIGLA je bolj izražen v centralnem delu jajčne celice okrog genetskega materiala. Modro se je pobarval tudi genetski material v glavi semenčice. Merilo (bela črta): 100 μm .

V nalogi smo torej s fluorescenčno mikroskopijo opazovali tudi jajčne celice, ki smo jih iz jajčnikov pridobili v še nezreli fazi (profaza I) z GV in jih nato izpostavili postopku IVM, ki je opisan v poglavju »Material in metode«. Pri teh jajčnih celicah je protein FIGLA bolj izražen v centralnem delu, njegovo izražanje pa se zmanjšuje z oddaljenostjo od genetskega materiala jajčne celice. Pri nekaterih IVM jajčnih celicah se v bližini jedra opazi celo manjšo zrnatost oz. točke, kjer je izražanje FIGLA nekoliko večje (Slika 13). Izražanje FIGLA v jajčnih celicah je sicer opazno širom celotne celice, vendar pa je le pri dozoreli jajčni celici obarvanost bolj homogena. Manj intenzivno obarvanost tako opazimo bolj na periferiji celice in tudi v neposredni bližini polarnega telesa, kar kaže na izražanje FIGLA preko glavne jedrne mase. Pri zreli jajčni celici je malce obarvana tudi ZP. Pri nedozorelih oziroma nezrelih jajčnih celicah pa se podobno

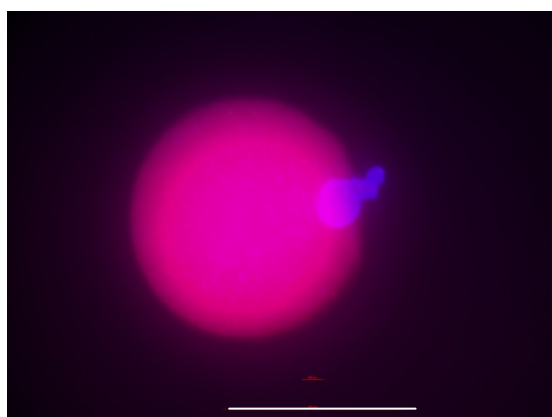
kot v prejšnjem poglavju ZP ni popolnoma nič obarvala. To dodatno dokazuje, da je izraženost proteina FIGLA v ZP odvisna od zrelosti jajčne celice.

4.3 DEVITRIFICIRANE JAJČNE CELICE

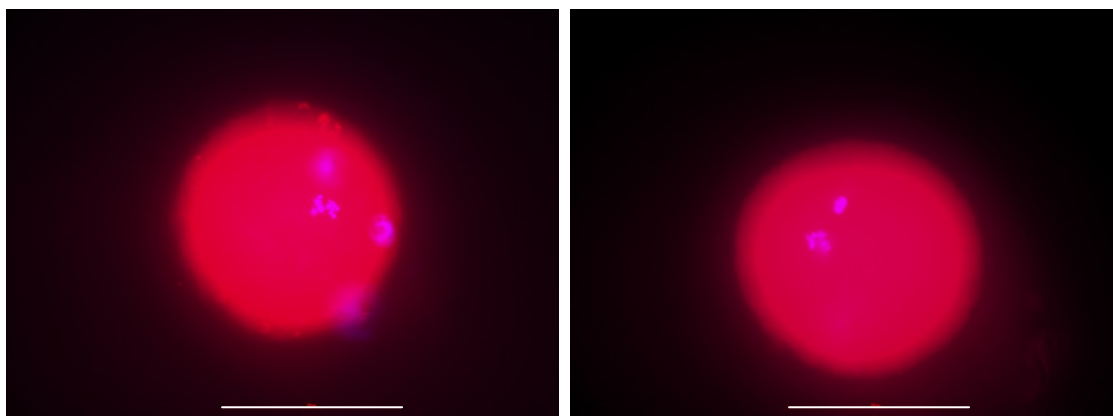
Obarvali smo tudi skupino jajčnih celic, ki so preživele postopek vitrifikacije (direktne potopitve v tekoči dušik), shranitve v tekočem dušiku in devitrifikacije (ogrevanja). Na Slikah 15, 16 in 17 lahko vidimo, da se je protein FIGLA v devitrificiranih jajčnih celicah močno izražal, podobno kot v svežih jajčnih celicah in je bil relativno homogeno razporejen po vsej jajčni celici, predvsem pri zrelih jajčnih celicah. Zanimivo je, da v ZP protein FIGLA ni bil izražen in to tako pri nezrelih kot pri zrelih jajčnih celicah.



Slika 15: Nezrela, devitrificirana jajčna celica, ki močno izraža protein FIGLA, a je ta rahlo nehomogeno razporejen po celici. Merilo (bela črta): 10 μm .



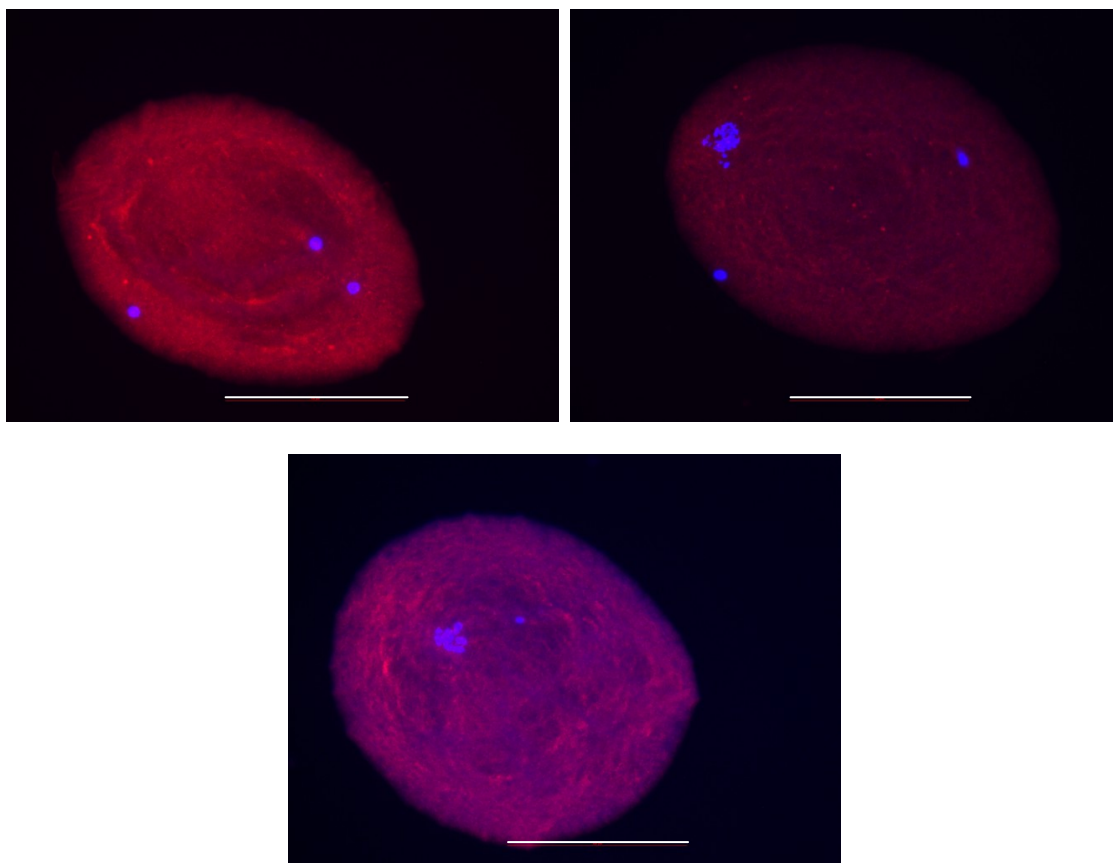
Slika 16: Zrela, devitrificirana jajčna celica. Merilo (bela črta): 100 μm .



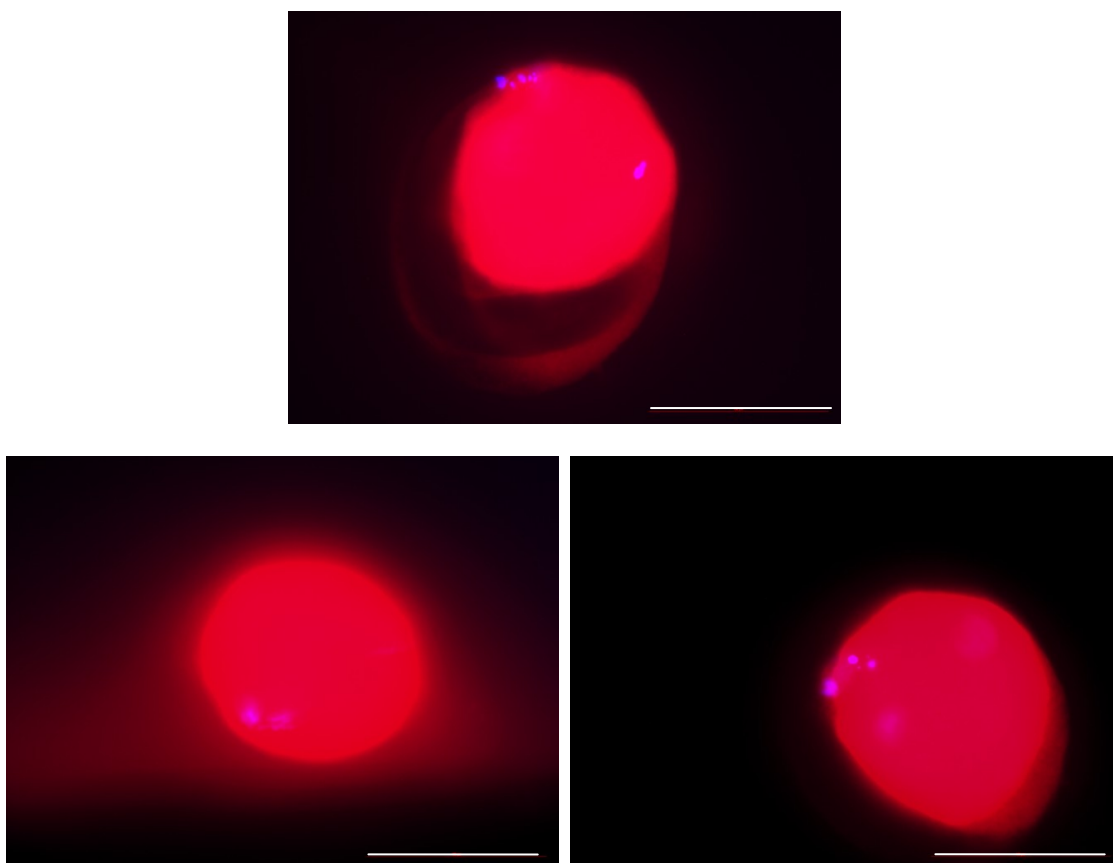
Slika 17: Dve zreli, devitrificirani jajčni celici (levo in desno) z močnim izražanjem proteina FIGLA, ki je bil homogeno razporejen po vsej jajčni celici. Na levi jajčni celici se je obarval tudi genetski material v glavicah spermijev. Merilo (bela črta): 100 μ m.

4.4 ODMRZNJENE JAJČNE CELICE

Poleg vitrificiranih jajčnih celic smo imunocitokemično obarvali tudi skupino jajčnih celic, ki smo jih prej počasi programsko postopno zamrznili, jih shranili v tekočem dušiku in jih nato hitro odmrznili. Pri nezrelih jajčnih celicah opazimo manjšo izraženost proteina FIGLA, ki pa je bil specifično izražen v nekakšnih nitkah, česar nismo opazili pri nobeni drugi skupini jajčnih celic (Slika 18), kar nakazuje na to, da je sam postopek zamrzovanja in odmrzovanja močno vplival na izraženost tega proteina v jajčnih celicah. Te nitke so bile bolj skoncentrirane v perifernem delu jajčnih celic. Nitasto izražanje proteina bi bilo lahko povezano s samim citoskeletom jajčne celice, vendar pa bi bilo to potrebno še dodatno raziskati. V odmrznjenih zrelih jajčnih celicah je bil protein FIGLA veliko močnejše izražen, podobno kot v svežih zrelih jajčnih celicah in to homogeno po vsej jajčni celici (Slika 19). Protein FIGLA je bil deloma izražen tudi v ZP dveh zrelih jajčnih celic (Slika 19, jajčna celica zgoraj in desno spodaj), med tem ko se pri nezrelih jajčnih celicah ZP ni obarvala.



Slika 18: Tri nezrele, odmrznjene jajčne celice (dve zgoraj in ena spodaj). Pri vseh treh jajčnih celicah je protein FIGLA relativno malo izražen in to specifično, v nitkah, ki so bolj skoncentrirane v perifernem delu jajčne celice. Merilo (bela črta): 100 μm .



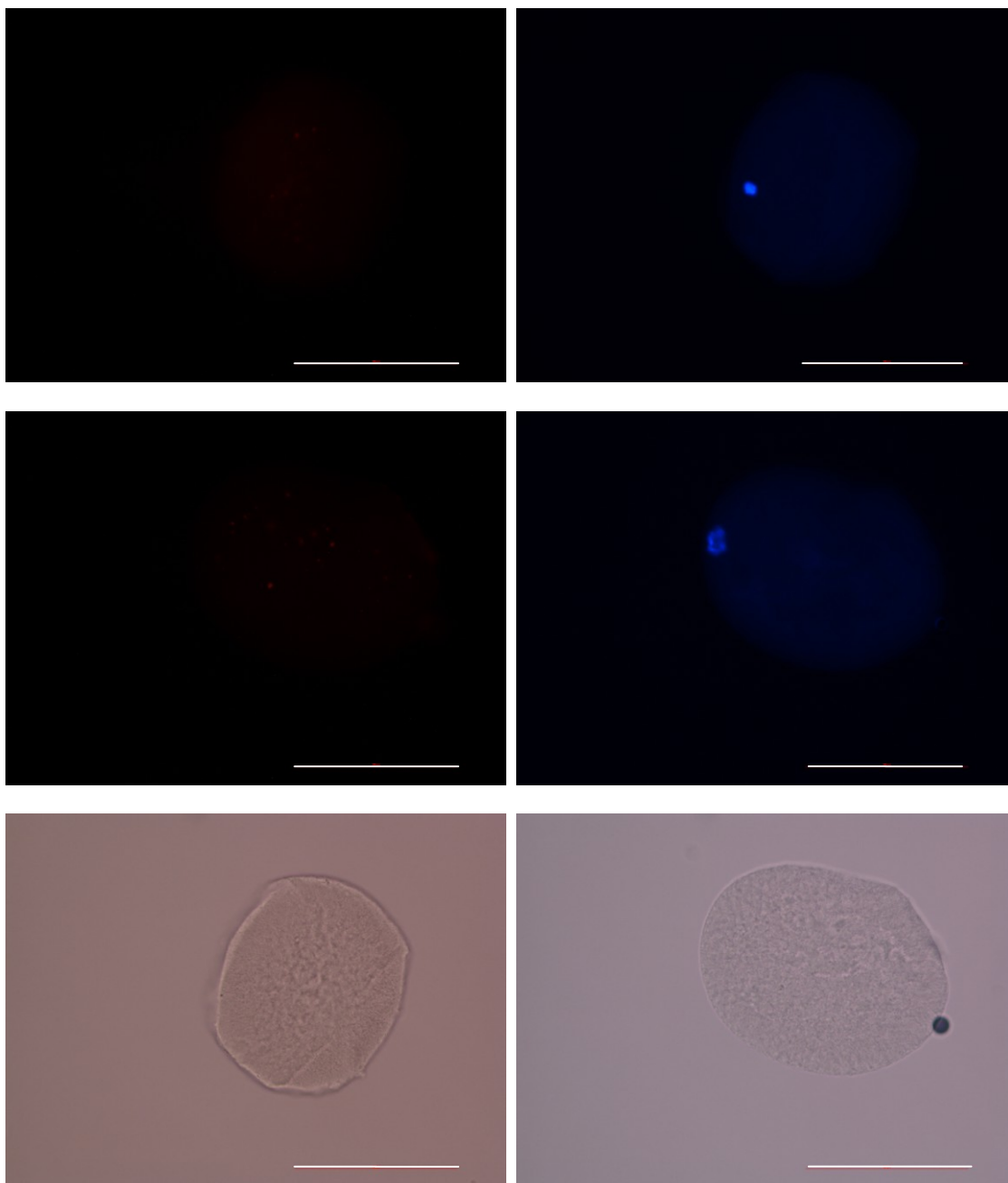
Slika 19: Tri zrele odmrznjene jajčne celice z močno izraženim proteinom FIGLA, ki je bil enakomerno razporejen po vsej celici (ena zgoraj in dve spodaj) in bistveno bolj izražen kot pri nezrelah jajčnih celicah na sliki 18. Pri dveh jajčnih celicah (zgoraj in desno spodaj) se je rahlo obarvala tudi ZP. Pri jajčni celici desno spodaj se je modro obarval tudi genetski material v glavicah semenčic.

Merilo (bela črta): 100 μ m.

Izražanje proteina FIGLA pri počasi zamrznjenih in nato odmrznjenih jajčnih celicah ne kaže nobenega specifičnega vzorca izraženosti glede na genetski material. Zagotovo lahko trdimo, da v odmrznjenih jajčnih celicah ni koncentriranja proteina okrog jedra oziroma genetskega materiala in ni zrnatega izražanja, ki je bilo opaženo pri jajčnih celicah v ostalih treh skupinah. Rezultati kažejo, da počasno zamrzovanje drastično vpliva na izraženost proteina FIGLA v nezrelah jajčnih celicah, med tem ko pri zrelih jajčnih celicah tega ni opaziti. Glede na to, se zrele jajčne celice kažejo bolj primerne za postopek počasnega zamrzovanja kot nezrele jajčne celice.

4.5 NEGATIVNA KONTROLA

Pri jajčnih celicah za negativno kontrolo smo izpustili primarna protitelesa in uporabili samo sekundarna protitelesa. Jajčne celice se pravilno niso obarvale za protein FIGLA in pod fluorescenčnim mikroskopom praktično niso kazale rdeče fluorescence (Slika 20).

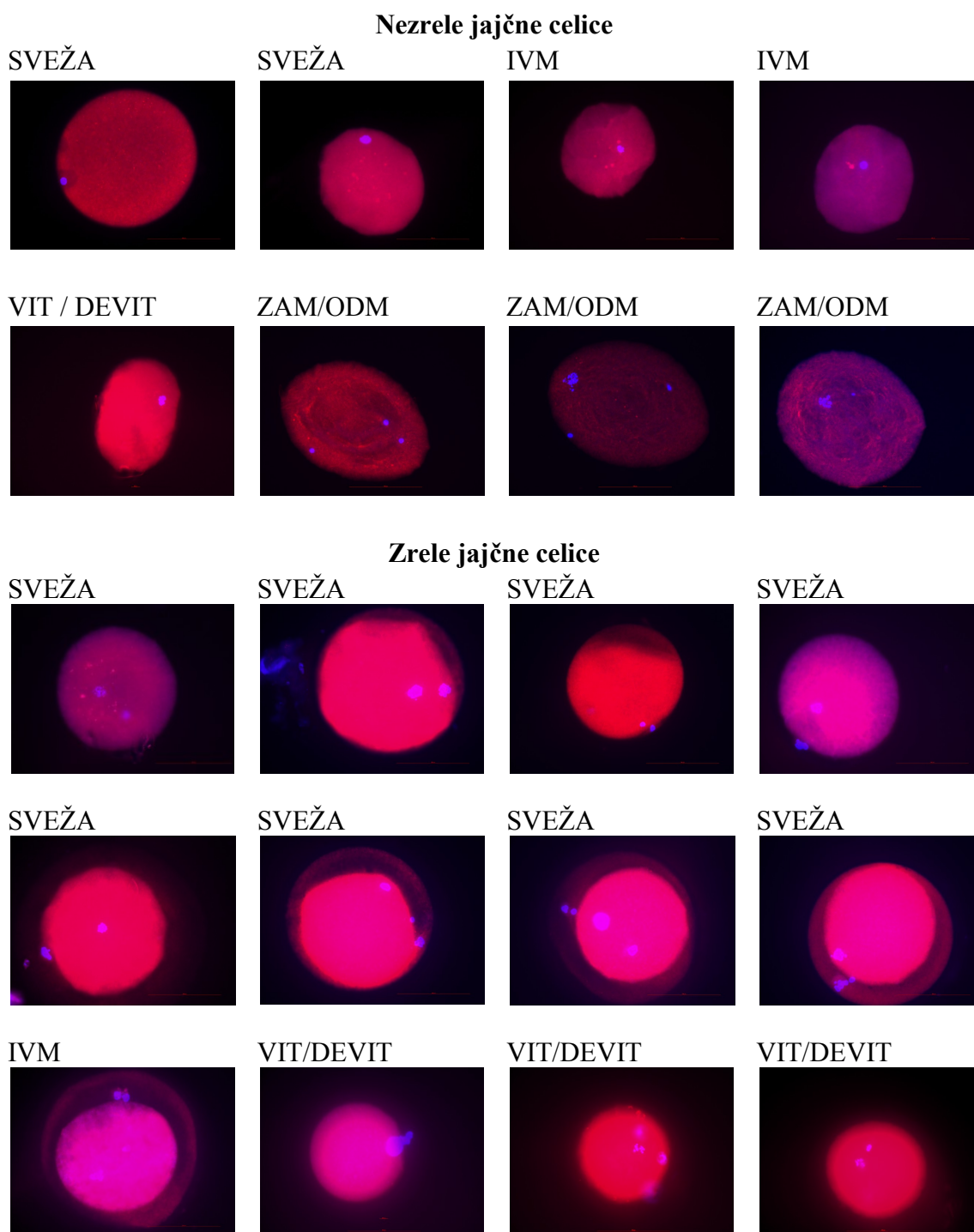


Slika 20: Negativna kontrola: dve nezreli jajčni celici, barvani samo s sekundarnimi protitelesi (levo) in DAPI (desno). Merilo (bela črta): 100 μm .

4.6 PRIMERJAVA IZRAŽENOSTI PROTEINA FIGLA V ZRELIH IN NEZRELIH JAJČNIH CELICAH

Naši rezultati kažejo na več bistvenih razlik med nezrelimi in zreliimi jajčnimi celicami. Protein FIGLA je bil v nezrelih jajčnih celicah manj izražen kot v zrelih jajčnih celicah ne glede na metodo ravnanja v programu IVF, kar je vidno na primerjalni sliki 20. Poleg

tega se je protein FIGLA izrazil v ZP samo pri zrelih jajčnih celicah, ne pa pri nezrelih jajčnih celicah, ne glede na metodo ravnanja v programu IVF (Slika 20). In ne nazadnje, pri nekaterih nezrelih jajčnih celicah je bil protein FIGLA bolj skoncentriran na obrobju jajčne celice, med tem ko je bil pri zrelih jajčnih celicah protein FIGLA bolj koncentriran v osrednjem delu (okrog genetskega materiala oziroma jedra) ali homogeno razporejen po celici.





Slika 21: Primerjava izraženosti proteina FIGLA glede na zrelost jajčnih celic. V nezrelih jajčnih celicah se je manj izražal kot v zrelih jajčnih celicah ne glede na metodo ravnanja v programu zunajtelesne oploditve. Protein FIGLA je bil izražen v ZP nekaterih zrelih jajčnih celic in pri nobeni od nezrelih jajčnih celic. Pri več nezrelih jajčnih celicah je bil protein FIGLA bolj izražen v obrobem delu celice, med tem ko je bil pri več zrelih celicah bolj izražen v centralnem delu jajčne celice, okrog genetskega materiala, ali pa homogeno razporejen po vsej celici.

4.7. VPLIV RAVNANJA V POSTOPKU ZUNAJTELESNE OPLODITVE NA IZRAŽENOST PROTEINA FIGLA V JAJČNIH CELICAH

Naši rezultati kažejo, da postopek IVM ni vplival na izraženost proteina FIGLA v jajčnih celicah, ki so dozorele *in vitro*. Pri nezrelih jajčnih celicah, ki kljub postopku IVM niso dozorele, pa je bil za razliko od svežih nezrelih jajčnih celic protein FIGLA bolj skoncentriran v centralnem delu celic in celo v obliki zrn, ki so se kopičila v predelu genetskega materiala (Slika 21). To je bil morda vzrok za to, da jajčne celice niso dozorele *in vitro* ali pa posledica tega postopka.

Postopek vitrifikacije in devitifikacije jajčnih celic je vplival na izraženost proteina FIGLA, saj je bilo tako pri nezrelih kot zrelih jajčnih celicah opaziti zelo močno izraženost proteina, večjo kot pri svežih nezrelih in predvsem zrelih jajčnih celicah (Slika 21). Protein FIGLA se ni izrazil v ZP nobene zrele ali nezrele jajčne celice po postopku vitrifikacije in devitifikacije. To nakazuje na morebiten negativni vpliv tega postopka na ZP jajčne celice. Tudi iz literature je razvidno, da postopki zamrzovanja in odmrzovanja lahko vplivajo na otrdevanje ZP oziroma njeno strukturo, zato se na odmrznjenih jajčnih celicah običajno izvaja zunajtelesna oploditev z metodo ICSI in ne klasični IVF z inseminacijo s spermiji, ker je le-ta neuspešen (Bianchi in sod., 2014; Wiesak in sod., 2017; Song in sod., 2016).

Tudi postopek počasnega zamrzovanja in odmrzovanja je vplival na izraženost proteina FIGLA v jajčnih celicah. Predvsem je bil vpliv viden pri nezrelih jajčnih celicah, v katerih se je protein relativno malo izrazil, a se je izrazil na povsem specifičen način, v obliki »nitk«, česar nismo opazili pri nobeni drugi skupini jajčnih celic. Te »nitke« proteina so bile bolj skoncentrirane na obrobju jajčnih celic (Slika 21). Za razliko od nezrelih jajčnih celic pa so zrele jajčne celice po zamrzovanju in odmrzovanju močno izražale protein FIGLA, močnejše kot sveže zrele celice (Slika 21). Pri zrelih jajčnih celicah je bil protein enakomerno razdeljen po jajčnih celicah, pri dveh jajčnih celicah pa je bil izražen tudi v ZP. V programu zunajtelesne oploditve je na splošno še odprto

vprašanje, ali je pri pacientkah bolje zamrzniti zrele ali nezrele jajčne celice za kasnejšo oploditev. Naši rezultati nakazujejo, da je primernejše zamrzovanje zrelih jajčnih celic zaradi potencialno manjšega negativnega vpliva zamrzovanja – odmrzovanja kot pri nezrelih jajčnih celicah.

5 SKLEPI

V magistrskem delu smo zajeli tako zrele kot nezrele jajčne celice, ki so prešle postopke vitrifikacije – devitifikacije, počasnega zamrzovanja – odmrzovanja, IVM ali pa so bile uporabljene sveže jajčne celice, ki so služile kot kontrola. Vse skupine jajčnih celic smo peljali skozi enak postopek označevanja za TF FIGLA, rezultati pa so se med skupinami opazno razlikovali.

Vzorci in jakost izražanja TF FIGLA zanesljivo kažejo na razlike, ki se pojavljajo med skupinami jajčnih celic, ki so prešle različne postopke, ki jih sicer redno uporabljajo za IVF, vendar pa je vprašanje, če so tovrstne razlike neposredno posledice metod ali pa metode vplivajo na izražanje FIGLA preko sprememb, ki jih sprožijo v strukturi in delovanju same jajčne celice. Izključiti pa ne moremo niti vpliva slabše kakovosti jajčnih celic, saj smo lahko kot zrele jajčne celice uporabili samo jajčne celice, ki se niso oplodile po postopku IVF.

Pri primerjavi različnih skupin jajčnih celic, glede na postopek za IVF in njihovo zrelost, smo ugotovili, da so med njimi pomembne razlike v vzorcu in jakosti izražanja FIGLA faktorja. V nekaterih celicah je bil vzorec izražanja proteina povezan z genetskim materialom, drugje je bilo tovrstno povezavo nemogoče zaznati. Jakost izražanja se je razlikovala med celicami, ki so bile podvržene različnim postopkom, ki jih uporabljajo v klinični praksi za IVF. Tudi pri vzorcih izražanja bi lahko govorili o vzorcih specifičnih za določeno skupino celic. Bistveno je torej poudariti, da so nekateri postopki za IVF bolj priporočljivi kot drugi, medtem ko je kvaliteta nekaterih, po opravljenih postopkih vsaj iz določenega vidika primerljiva s svežimi celicami.

Zaradi zahtevnosti računalniške analize slik jajčnih celic so bili rezultati ocenjeni predvsem kvalitativno, bi pa bilo zanimivo izpeljati še raziskavo z natančnejšo kvantitativno oceno. Prav tako bi bile za podrobnejše informacije o vplivu različnih metod, ki se uporabljajo za IVF, na izražanje FIGLA faktorja, potrebne podrobnejše molekulske in genetske raziskave.

6 POVZETEK

V današnjem času se veliko parov srečuje s problemi pri zanositvi, za kar je lahko razlog tudi slabša kakovost jajčnih celic. Ker je eden izmed ključnih faktorjev neplodnosti tudi neizražanje TF FIGLA v jajčni celici, nas je zanimalo, če in kako postopki vitrifikacije – devitifikacije, počasnega zamrzovanja – hitrega odmrzovanja in IVM jajčnih celic, ki jih uporabljajo v postopkih IVF, vplivajo na izražanje proteina FIGLA v humani jajčni celici. Transkripcijski faktor (TF) FIGLA se je v številnih predhodnih raziskavah pokazal kot zelo pomemben dejavnik, ki vpliva na plodnost pri ženskah. Omenjeni faktor je vključen v folikulogenezo, kjer je glavni dejavnik za začetek tvorbe PF, ki je ključen za dozorevanje in razvoj ženske jajčne celice, ter kvaliteto in kvantiteto jajčnih celic v jajčniku. Poleg folikulogeneze igra pomembno vlogo pri tvorbi ZP, ki predstavlja zaščito jajčne celice in igra pomembno vlogo pri samem procesu oploditve, hkrati pa je vpleten tudi v številne druge signalne mreže, ki so potrebne za normalno oogenezo. Številne študije so pokazale, da postopki, ki se uporabljajo kot MAR vplivajo na strukturo, genetiko, delovanje, posamezne organele znotraj jajčne celice ter posledično na celostno kvaliteto jajčne celice.

Jajčne celice, ki smo jih uporabili pri delu, smo pridobili od pacientk, ki so bile v postopku IVF, v skladu z njihovim pisnim soglasjem in na podlagi odobritve Komisije za medicinsko etiko (Ministrstvo za zdravje, RS). Del pridobljenih jajčnih celic smo vitrificirali, del smo jih krioprezervirali s postopkom počasnega zamrzovanja, del pa smo jih kot sveže opazovali takoj po odvzemu kot nezrele jajčne celice oziroma kot sveže zrele jajčne celice, ki se niso oplodile po postopku IVF. Delež jajčnih celic, ki ob aspiraciji iz jajčnikov še niso bile zrele, smo dozoreli *in vitro*. Vitrifikaciji in počasnemu zamrzovanju je sledila devitifikacija oziroma odmrzovanje, nato pa so vse skupine celic šle skozi enak postopek imunocitokemičnega označevanja za FIGLA faktor. Celice smo nato opazovali s svetlobnim mikroskopom in fluorescenčno mikroskopijo ter z uporabo Nis-Elements F programske opreme opazovali izražanje TF FIGLA. Pri celicah smo iskali kakršnekoli razlike v vzorcih in jakosti izražanja FIGLA faktorja, ki bi lahko bil povezan s postopkom skozi katerega je šla posamezna celica, ogledali pa smo si tudi razlike med zreli in nezreli jajčnimi celicami.

Vzorci izražanja TF FIGLA so bili zelo heterogeni že znotraj posameznih skupin celic, kljub temu pa smo odkrili določene značilnosti, ki so se znotraj dotičnih skupin ponavljali. Med skupinami so bile razlike v lokaciji najmočnejšega obarvanja za protein FIGLA v posamezni celici (v bližini jedra ali bolj na obrobju celice), v vzorcu pojavljanja, ki smo ga opazili znotraj skupine (homogena, točkasta ali nitasta razporeditev proteina) in jakosti obarvanja, ki so ga kazale posamezne jajčne celice. Kot zanimiva se kaže predvsem izraženost proteina FIGLA v ZP, ki se je pojavljala samo pri zrelih jajčnih celicah, ne pa pri nezrelih jajčnih celicah in pri jajčnih celicah po vitrifikaciji – devitifikaciji. Zaključimo lahko, da postopki vitrifikacije, *in vitro* zorenja

in počasnega zamrzovanja vplivajo na izraženost faktorja FIGLA v jajčnih celicah, vprašanje pa je ali je to posledica znanih vplivov teh postopkov na strukturo in delovanje jajčne celice ali gre za neposreden vpliv postopka na gen *FIGLA* oziroma izražanje proteina FIGLA.

7 VIRI

- Bayne R. A. L., Martins da Silva S. J., Anderson R. A. 2004. Increased expression of the FIGLA transcription factor is associated with primordial follicle formation in the human fetal ovary. *Molecular Human Reproduction*, 10, 6: 373 – 381
- Bianchi V., Macchiarelli G., Borini A., Lappi M., Cecconi S., Miglietta S., Familiari G., Nottola S. A. 2014. Fine morphological assessment of quality of human mature oocytes after slow freezing or vitrification with closed device: a comparative analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12:110
- Cao X., Li J., Xue H., Wang S., Zhao W., Du Z., Yang Y., Yue Z. 2017. Effect of vitrification on meiotic maturation, mitochondrial distribution and glutathione synthesis in immature silver fox cumulus oocyte complexes. *Theriogenology*, 91: 104 – 111
- Chen H., Zhang L., Deng T., Zou P., Wang Y., Quan F., Zhang Y. 2016. Effects of oocyte vitrification on epigenetic status in early bovine embryos. *Theriogenology*, xxx, 1 – 11
- Choi J. K., Yue T., Huang H., Zhao G., Zhang M., He X. 2015. The crucial role of zona pellucida in cryopreservation of oocytes by vitrification. *Cryobiology*, 71, 2: 350 – 355
- Cobo A., Domingo J., Pérez S., Crespo J., Remohí J., Pellicer A. 2008. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. *Clinical and Translational Oncology*, 10, 5: 268 – 273
- Cobo A., Garcia-Velasco J. A., Coelho A., Domingo J., Pellicer A., Remohí J. 2016. Oocytes vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertility and Sterility*, 105, 3: 755 – 764
- Čížek-Sajko M., Vlaisavljević V., Kovač V. 2007. Zorenje človeških jajčnih celic v pogojih *in vitro*. *Zdravniški vestnik*, 76: 19 – 26
- De Vos M., Smits J., Woodroof T. K. 2014. Fertility preservation in women with cancer. *The Lancet*, 384: 1302 – 1310
- Fabrizi R., Vicenti R., Macciocca M., Martino N. A., Dell'Aquila M. E., Pasquinelli G., Morselli-Labate A. M., Seracchioli R., Paradisi R. 2016. Morphological, ultrastructural and functional imaging of frozen/thawed and vitrified/warmed human ovarian tissue retrieved from oncological patients. *Human Reproduction*, 31, 8: 1838 – 1849
- Fowler P. A., Flannigan S., Mathers A., Gillanders K., Lea R. G., Wood M. J., Maheshwari A., Bhattacharya S., Collie-Duguid E. S. R., Baker P. J., Monteiro A., O'Shaughnessy P. J. 2009. Gene Expression Analysis of Human Fetal Ovarian Primordial Follicle Formation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94, 4: 1427 – 1435

- Franciosi F., Goudet G., Tessaro I., Papillier P., Dalbies-Tran R., Reigner F., Deleuze S., Douet C., Miclea I., Lodde V., Luciano A. M. 2015. In vitro maturation affects chromosome segregation, spindle morphology and acetylation of lysine 16 on histone H4 in horse oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, doi: 10.1071/RD15350: 10 str. (21. avg. 2017)
- Herraiz S., Novella-Maestre E., Rodríguez B., Diaz C., Sánchez-Serrano M., Mirabet V., Pellicer A. 2014. Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezin versus vitrification, effect of different procedures and devices. *Fertility and Sterility*, 101, 3: 775 – 784
- Hu W., Gauthier L., Baibakov B., Jimenez-Movilla M., Dean J. 2010. FIGLA, a Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, Balances Sexually Dimorphic Gene Expression in Postnatal Oocytes. *Molecular and Cell Biology*, 30, 14: 3661 – 3671
- Huntriss J., Gosden R., Hinkins M., Oliver B., Miller D., Rutherford A. J., Picton H. M. 2002. Isolation, characterization and expression of the human Factor In the Germline alpha (FIGLA) gene in ovarian follicles and oocytes. *Molecular Human Reproduction*, 8, 12: 1087-1095
- Joonè C.J., Schulman M.L., Bertschinger H.J., Ovarian dysfunction associated with zona pellucida-based immunocontraceptive vaccines. *Theriogenology*, 89: 329 – 337
- Joshi S., Davies H., Porter Sims L., Levy S. E., Dean J. 2007. Ovarian gene expression in the absence of FIGLA, an oocyte-specific transcription factor. *BMC Developmental Biology*, 7:67, doi: 10.1186/1471-213X-7-67: 13 str. (7. jun. 2017)
- Levine J., Canada A., Stern C. J. 2010. Fertility Preservation in Adolescents and Young Adults With Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28, 32: 4831 – 4841
- Imaging and microscopy. 2005. Fluorescence: basics, techniques, advantages. <http://www.imaging-git.com/science/light-microscopy/fluorescence-basics-techniques-advantages> (4. jun. 2017)
- Liu M., Zhou W., Chu D., Fu L., Sha W., Liu S., Li Y. 2017. A modified vitrification method reduces spindle and chromosome abnormalities. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. doi: 10.1080/19396368.2017.1285370: 8 str. (10. mar. 2017)
- Medical dictionary. Fertilized egg cell. <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Fertilized+egg+cell> (15. avg. 2017)
- Microscopemaster, Immunofluorescence microscopy. <http://www.microscopemaster.com/immunofluorescence-microscopy.html> (4. jun. 2017)
- Nagy Z. P., Anderson R. E., Feinberg E. C., Hayward B., Mahony M. C. 2017. The Human Oocyte Preservation Experience (HOPE) Registry: evaluation of cryopreservation techniques and oocyte source on outcomes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 15:10

- Nohales-Córcoles M., Sevillano-Almerich G., Di Emidio G., Tatone C., Cobo A.C., Dumollard R., De los Santos Molina M. J. 2016. *Human Reproduction*, 31, 8:1850 – 1858
- Nurudeen S. K., Douglas N. C., Mahany E. L., Sauer M. V., Choi J. M. 2016. Fertility Preservation Decisions Among Newly Diagnosed Oncology Patients: A Single-Center Experience. *American Journal of Clinical Oncology*, 39, 2: 154 – 159
- Pangas S. A., Rajkovic A. 2006. Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters. *Human Reproduction Update*, 12, 1: 65-76
- Sadava D., Heller H. C., Orians G. H., Purves W. K., Hillis D. M. 2006. *Life: The science of biology*. 8th ed. Sunderland, Sinauer Associates: 1251 str.
- Sanfilippo S., Canis M., Smitz J., Sion B., Darcha C., Janny L., Brugnion F. 2015. Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13:67, doi: 10.1186/s12958-015-0065-5: 7 str. (1. feb. 2016)
- Song W., Peng Z., Chen X., Jin H., Yao G., Shi S., Yang H., Zhang X., Sun Y. 2016. Effects of Vitrification on Outcomes of In Vivo-Mature, In Vitro-Mature and Immature Human Oocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38: 2053 – 2062
- Soyal S. M., Amleh A., Dean J. 2000. FIG α , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 127: 4645-4654
- Sun Y., Gu R., Lu X., Zhao S., Feng Y. 2016. Vitrification of in vitro matured oocytes diminishes embryo development potential before but not after embryo genomic activation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33, 2: 231 - 236
- Suzuki N., Yoshioka N., Takae S., Sugishita Y., Tamura M., Hashimoto S., Morimoto Y., Kawamura K. 2015. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Human Reproduction*, 30, 3: 608 – 615
- Štimpfel M., Vrtačnik-Bokal E., Požlep B., Virant-Klun I. 2015. Comparison of GnRH Agonist, GnRH Antagonist, and GnRH Antagonist Mild Protocol of Controlled Ovarian Hyperstimulation in Good Prognosis Patients, *Clinical Study*. *International Journal of Endocrinology*, 2015: 385049, doi: 10.1155/2015/385049: 6 str. (16. jun. 2017)
- Tosh D., Rani H. S., Murty U. S., Deenadayal A., Grover P. 2014. Mutational analysis of the FIGLA gene in women with idiopathic premature ovarian failure. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society*, 22, 5: 520-526
- Virant-Klun I., Meden-Vrtovec H., Tomaževič T. 2002. Od nastanka gamet do rojstva: oploditev z biomedicinsko pomočjo: teoretični in slikovni prikaz nastanka gamet, zgradbe gamet in tehnik oploditve z biomedicinsko pomočjo: (izkušnje na Ginekološki kliniki v Ljubljani). *Radovljica: Didakta*: 255 str.

- Virant-Klun I. 2004. Ta čudoviti zarodek: atlas spolnih celic in zarodkov pri zunajtelesni oploditvi. Ljubljana, samozaložba: 135 str.
- Virant-Klun I., Bacer-Kermavner L., Tomazevic T., Vrtacnik-Bokal E. 2011. Slow oocyte freezing and thawing in couples with no sperm or an insufficient number of sperm on the day of *in vitro* fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9:19
- Virant-Klun I., Leicht S., Hughes C., Krijgsveld J. 2016. Identification of maturation-specific proteins by single-cell proteomics of human oocytes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15, 8: 2616-2627.
- Wiesak T., Wasielek M., Zlotkowska A., Milewski R. 2017. Effect of vitrification on the zona pellucida hardening and follistatin and cathepsin B genes expression and developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. *Cryobiology*, 76, 1: 18 – 23
- Wilson M. S., Bacic A. 2012. Preparation of plant cells for transmission electron microscopy to optimize immunogold labeling of carbohydrate and protein epitopes. *Nature Protocols* 7, 1716–1727, doi:10.1038/nprot.2012.096: 12 str. (1. jun. 2017)
- Wood M. J. 2012. Vitrification of oocytes. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 14: 45 – 49
- Zhang P., Kerkelä E., Skottman H., Levkov L., Kivinen K., Lahesmaa R., Hovatta O., Kere J. 2007. Distinct sets of developmentally regulated genes that are expressed by human oocytes and human embryonic stem cells. *Fertility and Sterility*, 87, 3: 677 – 690

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila mentorici prof. dr. Irmi Virant-Klun, ki mi je omogočila opravljanje magistrskega dela. Hvala za Vaše usmerjanje, pomoč ter spodbudo pri izdelavi magistrskega dela! Zahvalila bi se tudi osebju Laboratorija za oploditev z biomedicinsko pomočjo, ki so mi bili vedno pripravljeni priskočiti na pomoč ter svetovati pri tehniških in vsebinskih zagatah.

Zahvala tudi recenzentu prof. dr. Marku Kreftu za strokovni pregled magistrskega dela.

Na koncu pa se zahvaljujem še družini, fantu, študijskim kolegom in prijateljem, ki so verjeli vame tekom celotnega študija, mi pomagali in me spodbujali pri pisanju magistrske naloge.

PRILOGA A

Soglasje Komisije za medicinsko etiko za raziskavo vpliva postopkov zunajtelesne oploditve na kakovost jajčnih celic



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA ZDRAVJE

Štefanova ulica 5, 1000 Ljubljana

T: 01 478 60 01

F: 01 478 60 58

E: gp.mz@gov.si

www.mz.gov.si

Prof. dr. Irma Virant-Klun, univ. dipl. biol.
Laboratorij za oploditev z biomedicinsko pomočjo
Ginekološka klinika
Univerzitetni klinični center
Šlajmerjeva 3
1525 Ljubljana

Številka: 0120-222/2016-2
KME 115/04/16
Datum: 8. junij 2016
Zadeva: Ocena etičnosti predloga raziskave

Spoštovana gospa prof. dr. Virant Klun,

Komisiji za medicinsko etiko (KME) ste z datumom 11. 4. 2016 poslali v oceno etične sprejemljivosti predlog raziskave z naslovom

"In vitro dozorevanje in vitifikacija jajčnih celic pri neplodnih in onkoloških pacientkah v programu zunajtelesne oploditve". Razvojni projekt v UKC Ljubljana.

KME je na nadaljevanju aprilske seje 5. maja 2016 ocenila, da je predlog raziskave etično sprejemljiv, in vam s tem izdaja svoje soglasje za njeno izvedbo. Seznam članov, ki so odločali o vlogi, je na voljo na spletni strani KME.

Lepo pozdravljam,

Pripravil:
Tone Žakelj

Anton
Zakelj
Digitalno
podpisal Anton
Zakelj
Datum:
2016.09.22
09:31:01
+02'00'

dr. Božidar Voljč, dr. med.,
predsednik KME