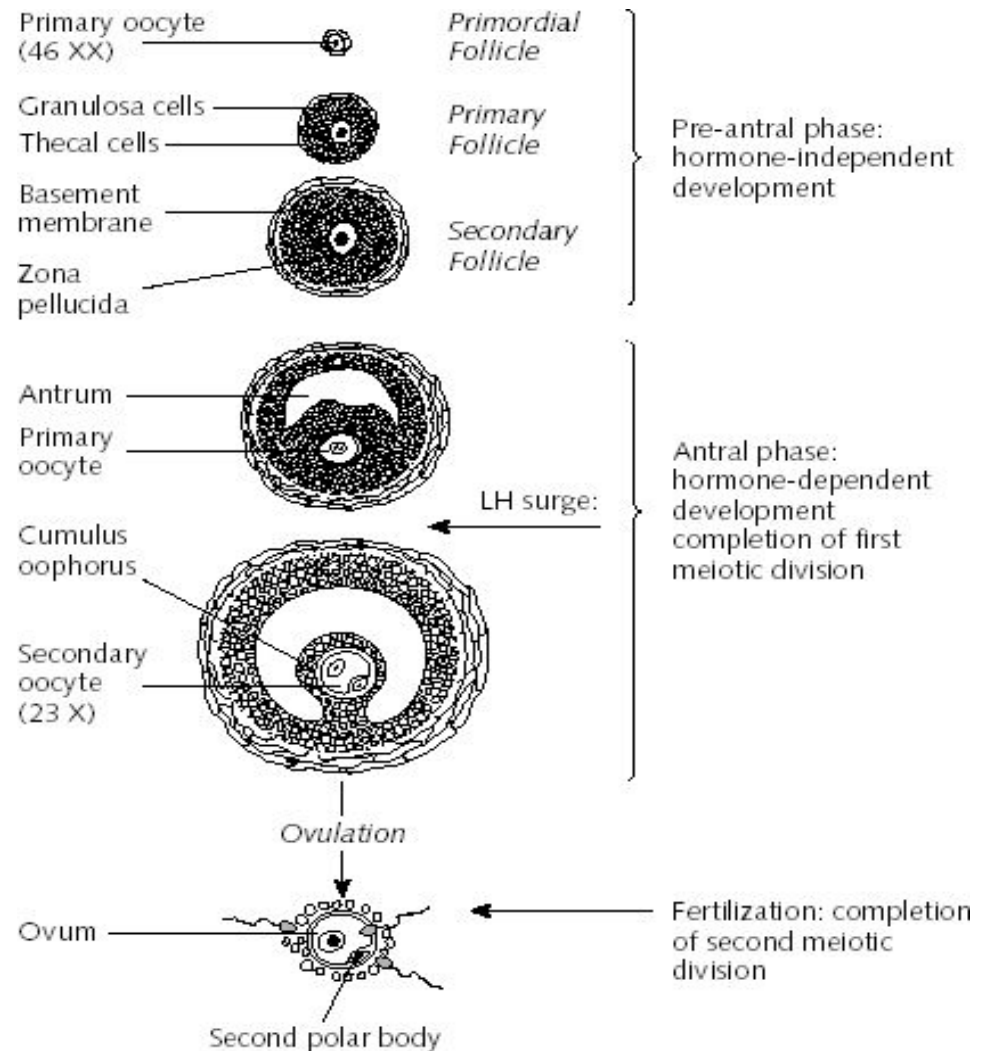


Vliv folikulární tekutiny na proliferaci lidských granulózových buněk

*Ústav histologie a embryologie,
Lékařská fakulta v Hradci králové,
Univerzita Karlova v Praze*

Granulózové buňky (GCs, Granulosa Cells)

- Buňky membrana granulosa jsou součástí ovariálních folikulů.
- Interagují s oocytem v průběhu zrání folikulu.
- Produkuje růstové faktory, steroidní hormony (estradiol) do folikulární tekutiny.
- Fyziologicky jsou pod vlivem FSH (stimuluje jejich proliferaci) a LH (stimuluje diferenciaci GCs).

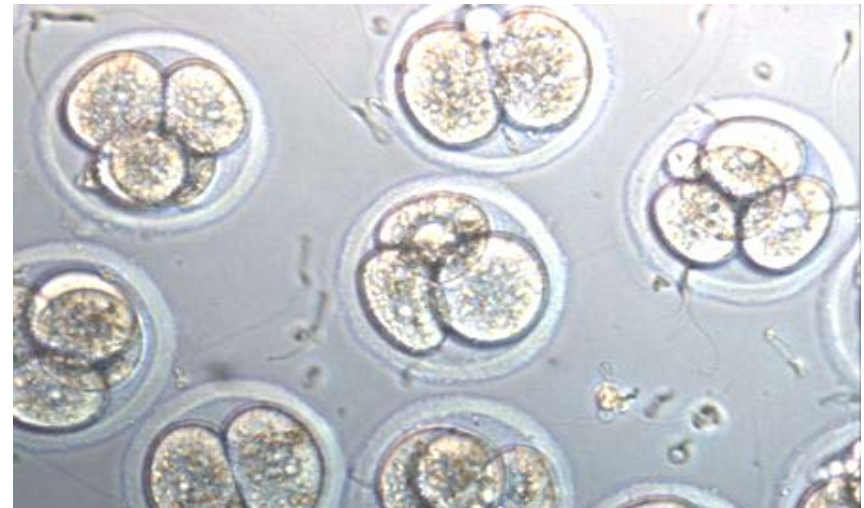


In vitro fertilizace

- 15% neplodných párů
- 24 center asistované reprodukce
- 9 000 IVF cyklů za rok
- Ročně 3 000 nově narozených dětí „ze zkumavky“
tj. 3% ze všech narozených.
- V ČR žije v současnosti 23 000 dětí narozených díky IVF.
- Příčiny neplodnosti a výskytu komplikací IVF?



iscare ivf



Sir Ganga Ram Hospital, Centre of IVF & Human Reproduction

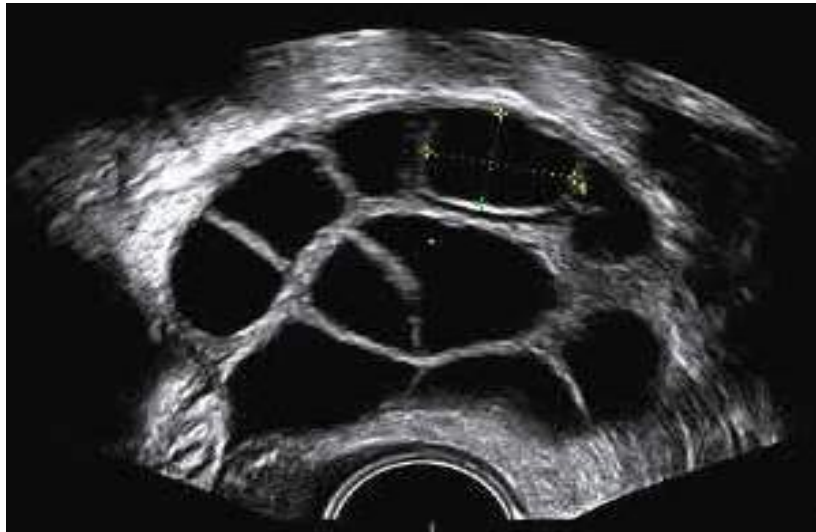
Cíl studie

- **Nalezení optimálního protokolu pro kultivaci lidských granulózových buněk (GCs).**
- **Stanovení základních biologických charakteristik primárních kultur GCs:**
 - morfologické změny
 - proliferace (růstu buněk)
 - karyotyp
 - fenotyp
 - délka telomer
- **Účel studie:**

Primokultury GCs by mohly představovat vhodný model pro studium hormonálních regulací spojených se zráním folikulu a přípravu oocyту pro fertilizaci.

Odběr vajíček a izolace GCs

- v celkové anestezii
- pacientky ve věku 23 – 43 let
- průměrné hodnoty (n = 25):
 - 9 ± 6 folikulů
 - 6 ± 4 oocytů
 - 17 ± 13 ml folikulární tekutiny



Victoria Fertility Centre



Sir Ganga Ram Hospital, Centre of IVF & Human Reproduction

Metody

- **Kultivace**

Složení média - Dulbecco's Modified Eagle's médium, 2% fetalního telecího séra, kyselina askorbová, dexamethason, L-glutamin, gentamycin, penicilin, streptomycin, růstové faktory (EGF, bFGF) a FSH.

- **Karyotyp**

Buňky + demecolcemid (4hod) - trypsin-EDTA - lýza hypotonickým KCl a fixace. Preparáty byly analyzovány softwarem Ikaros 5.0 (MetaSystems).

- **Fenotyp**

Průtokový cytometr - Cell Lab Quanta™SC, (Beckman Counter), data analyzována CXP softwarem.

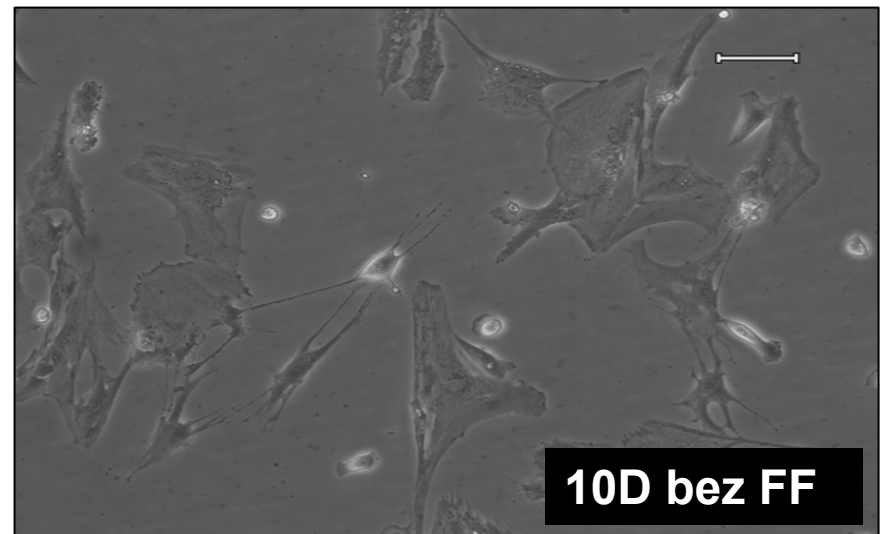
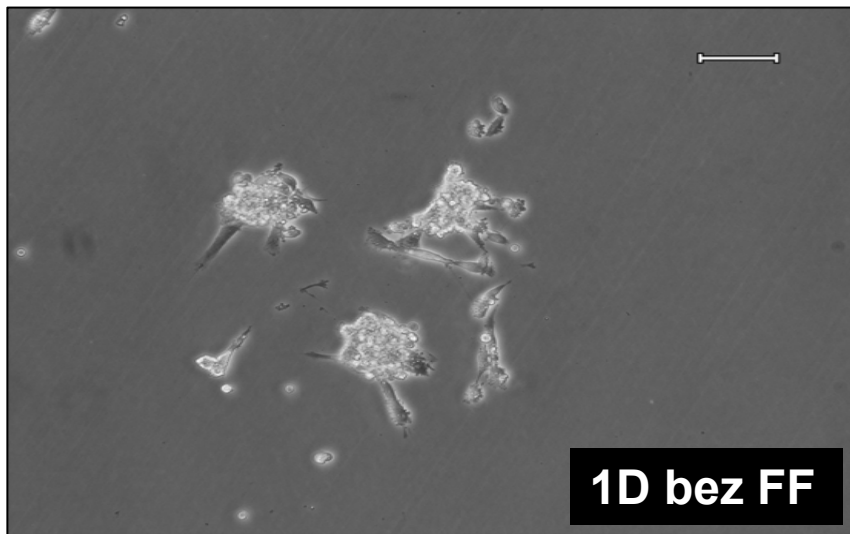
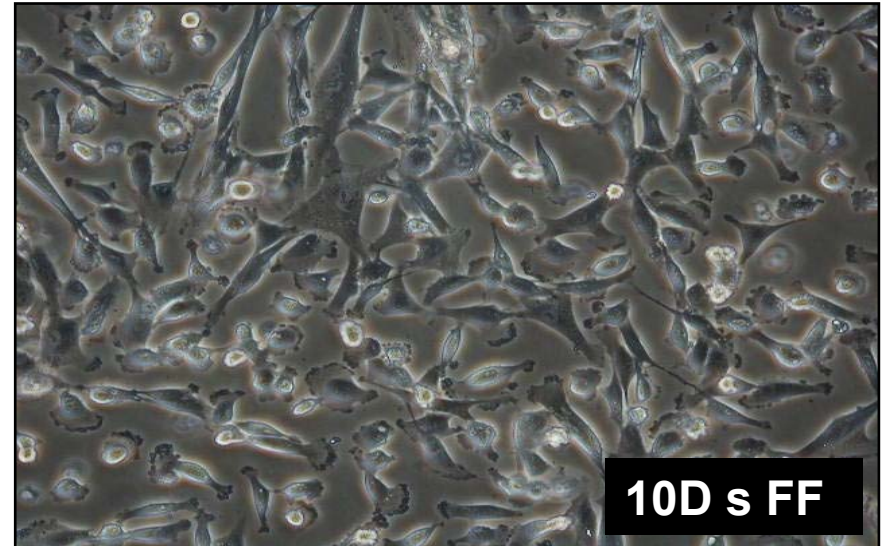
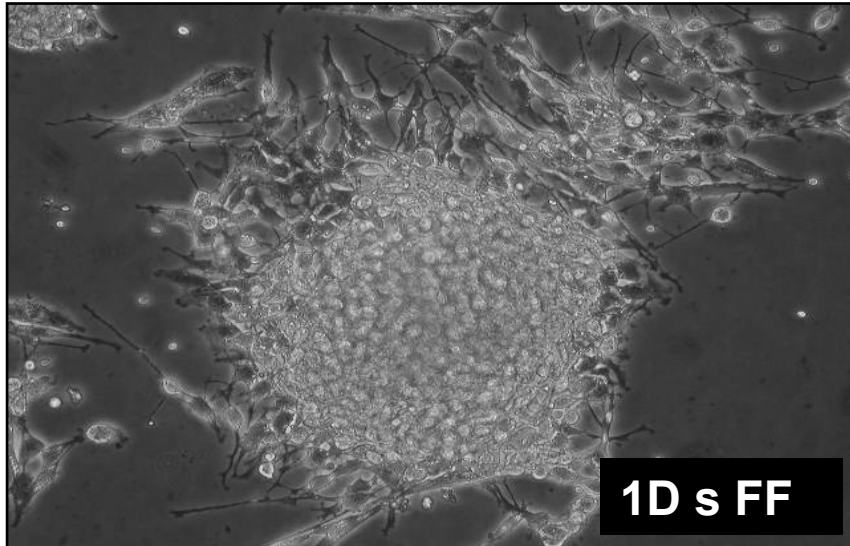
- **Buněčný cyklus**

DNA analýza buněk – pomocí DNA Prep kit (Beckman Counter).

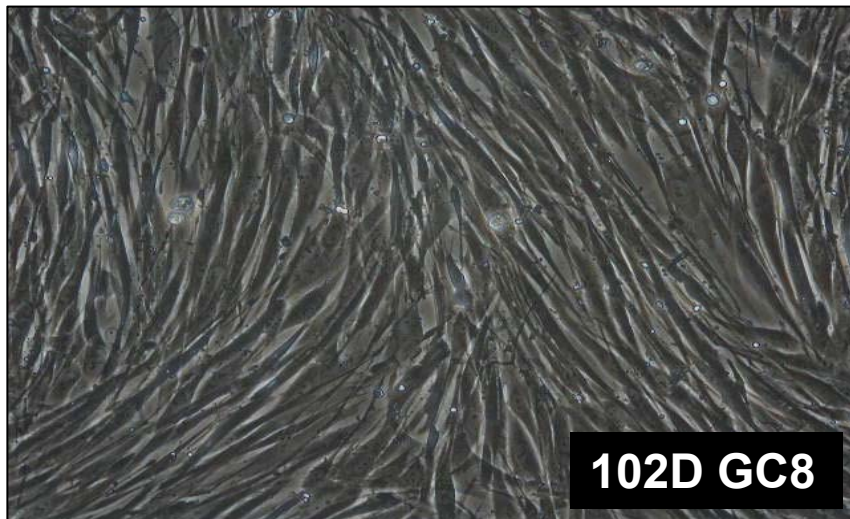
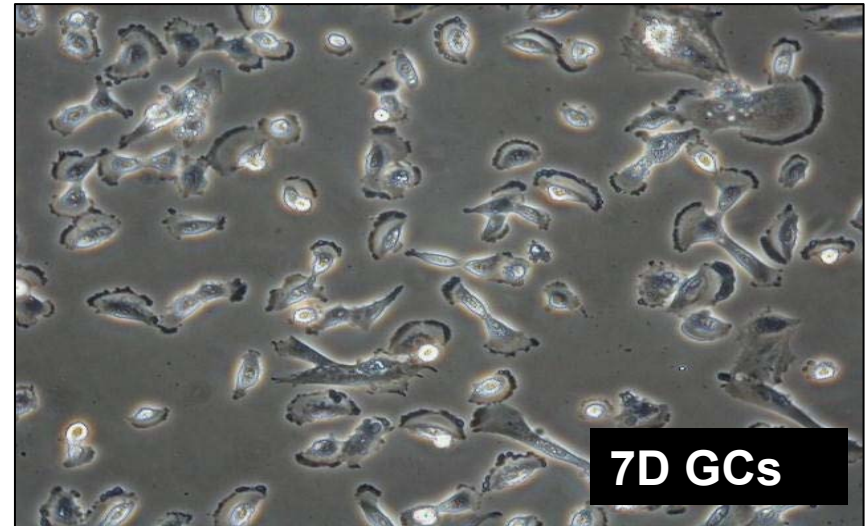
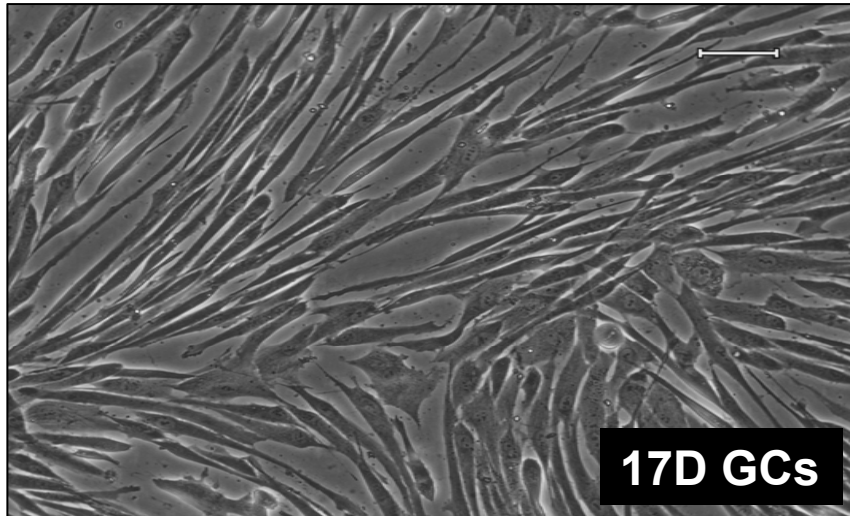
- **Měření délky telomer**

Genomická DNA byla extrahována z buněk pomocí DNeasy Tissue Kit (Qiagen). Měření délky telomer bylo provedeno qPCR (SYBR Green) podle Cawthon (2002).

Vliv folikulární tekutiny na kultivaci



Dlouhodobě proliferující linie granulózových buněk (GC8)

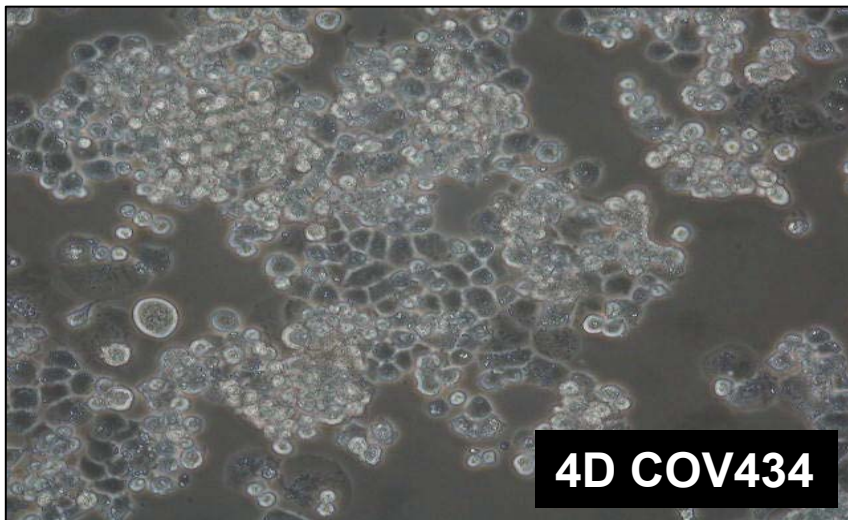
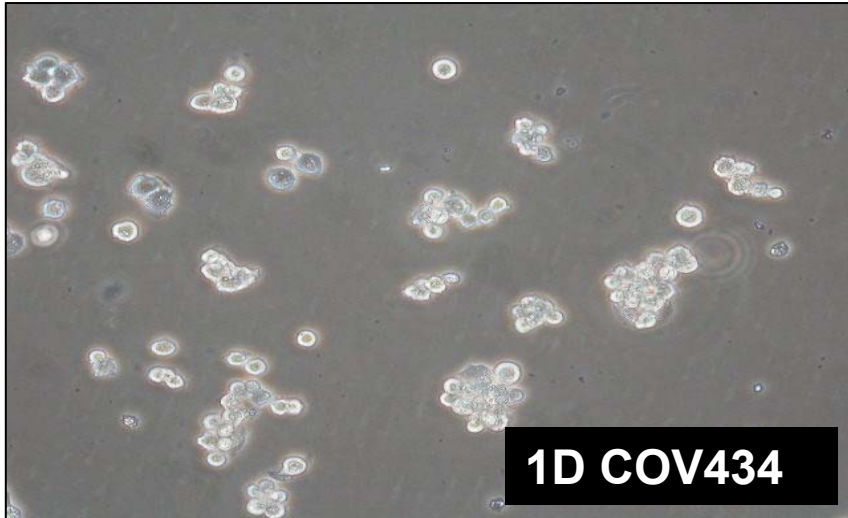


Vzorek (GC8) – dlouhodobě proliferující linie – stejné *in vitro* podmínky.

Délka *in vitro* kultivace byla 3x delší než u ostatních vzorků GCs.

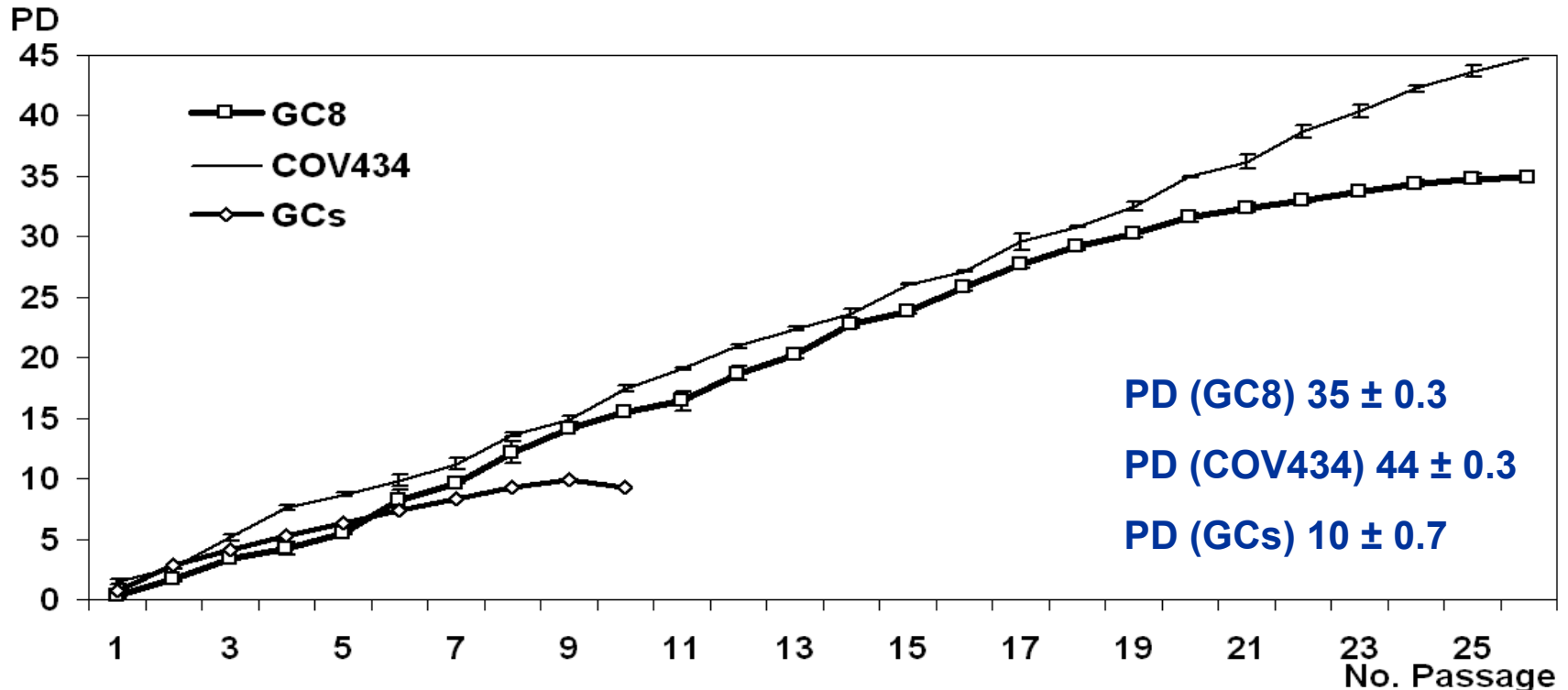
Bez morfoložických změn (102 dnů) !!!

Nádorová linie COV434



- Linie **imortalizovaných** granulózových buněk (COV434) byla izolována z primárního nádoru buněk granulózy v 1984 od dvacetisedmileté ženy.
- COV434 linie byla kultivována v Dulbecco modified Eagle's médiu s 10% séra a L-glutaminem.
- **Zhang at al. (2000)** - během 38 pasáží linie COV434 nemění svoje vlastnosti.

Population Doublings (PD)



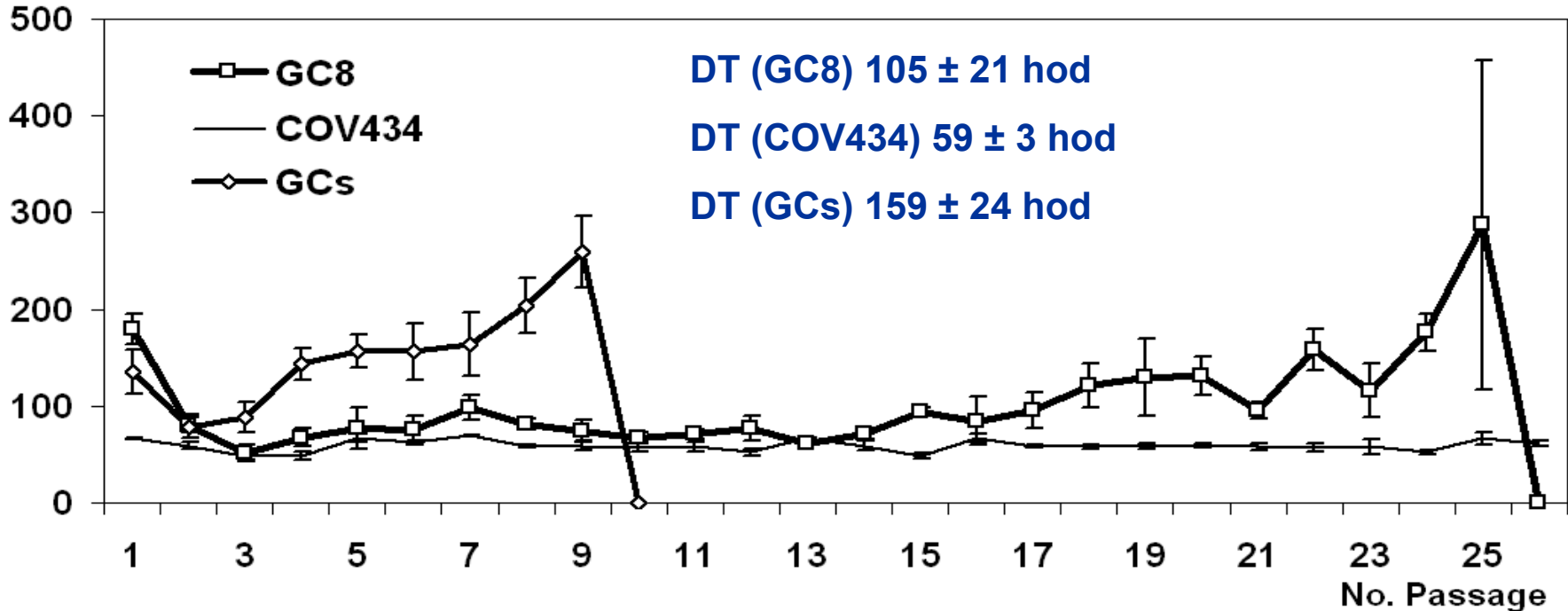
Počet populačních zdvojnásobení:

$$\text{No (PD)} = (\log N_t - \log N_0) / 0,301.$$

No (PD) [počet populačních zdvojnásobení],
N_t [počet buněk po enzymatické disociaci],
N₀ [počet nasazených buněk].

Doubling Time (DT)

DT (hrs)

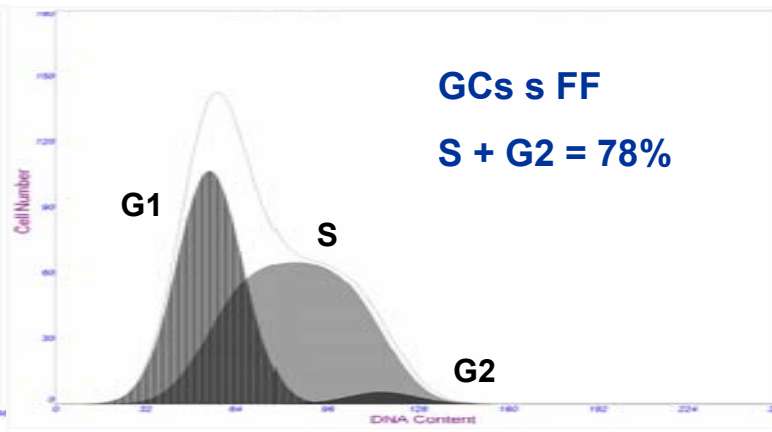
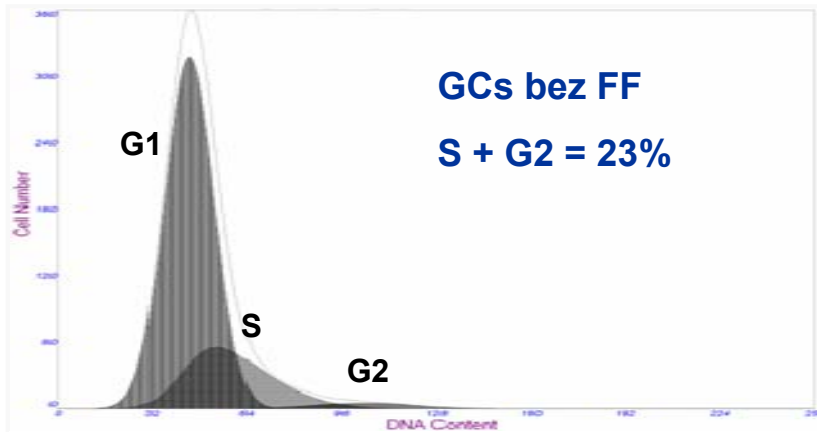


Čas potřebný na zdvojnásobení populace:

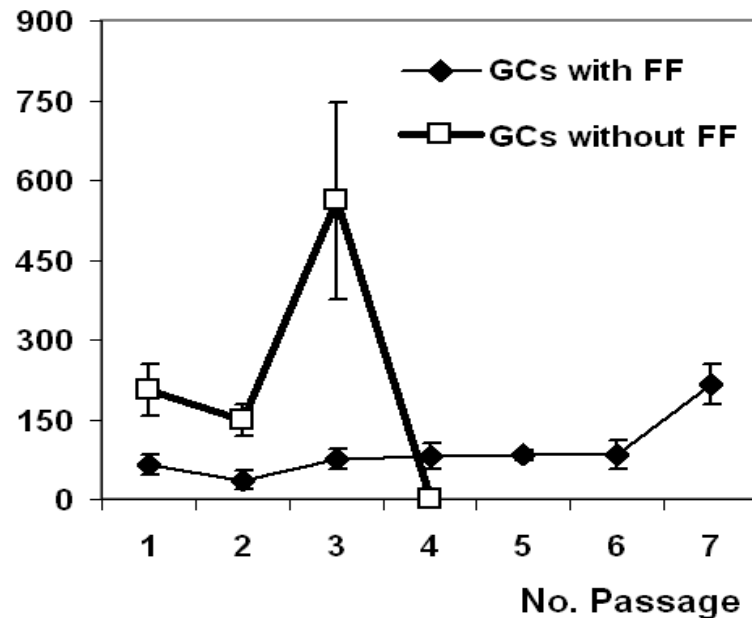
$$DT = (t \times \log 2) / (\log N_t - \log N_0)$$

DT [čas potřebný na zdvojnásobení populace], t [čas mezi nasazením a sběrem buněk], N_t [počet buněk po enzymatické disociaci], N_0 [počet nasazených buněk].

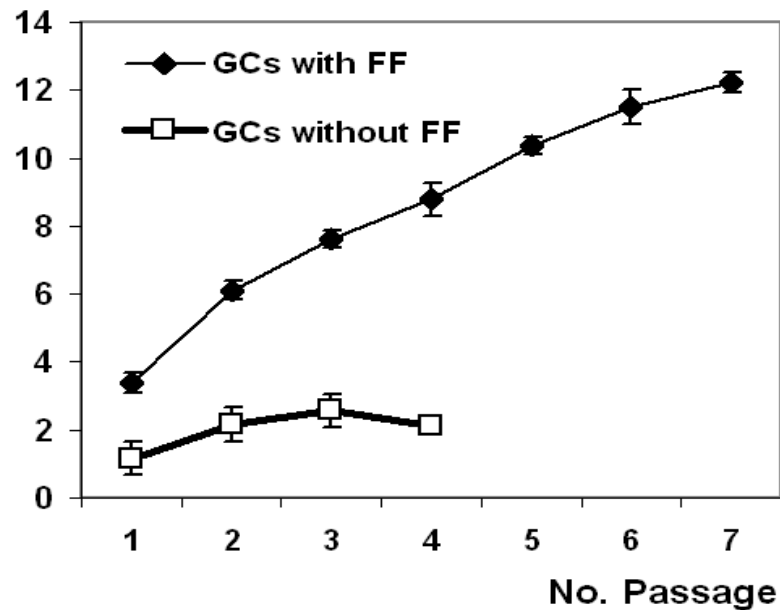
Vliv folikulární tekutiny na GCs



DT (hrs)

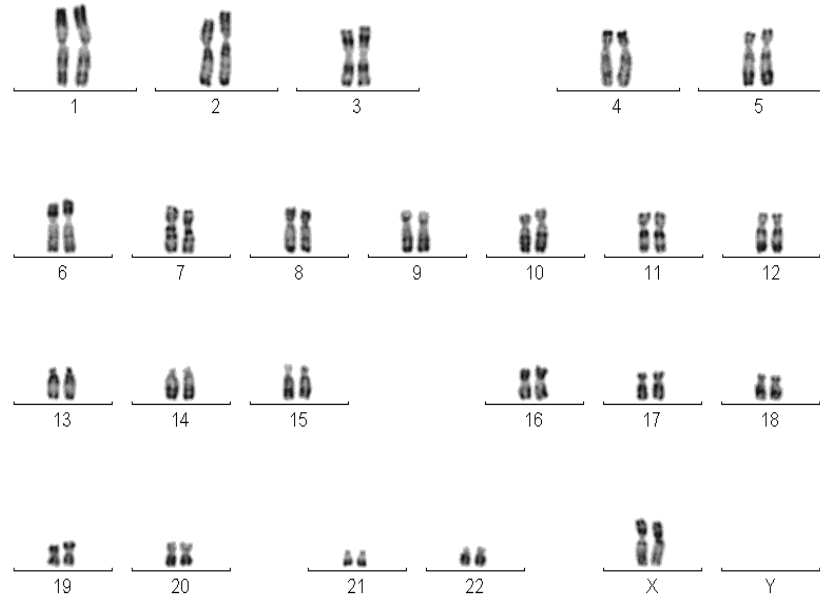


PD



Vyšetření karyotypu

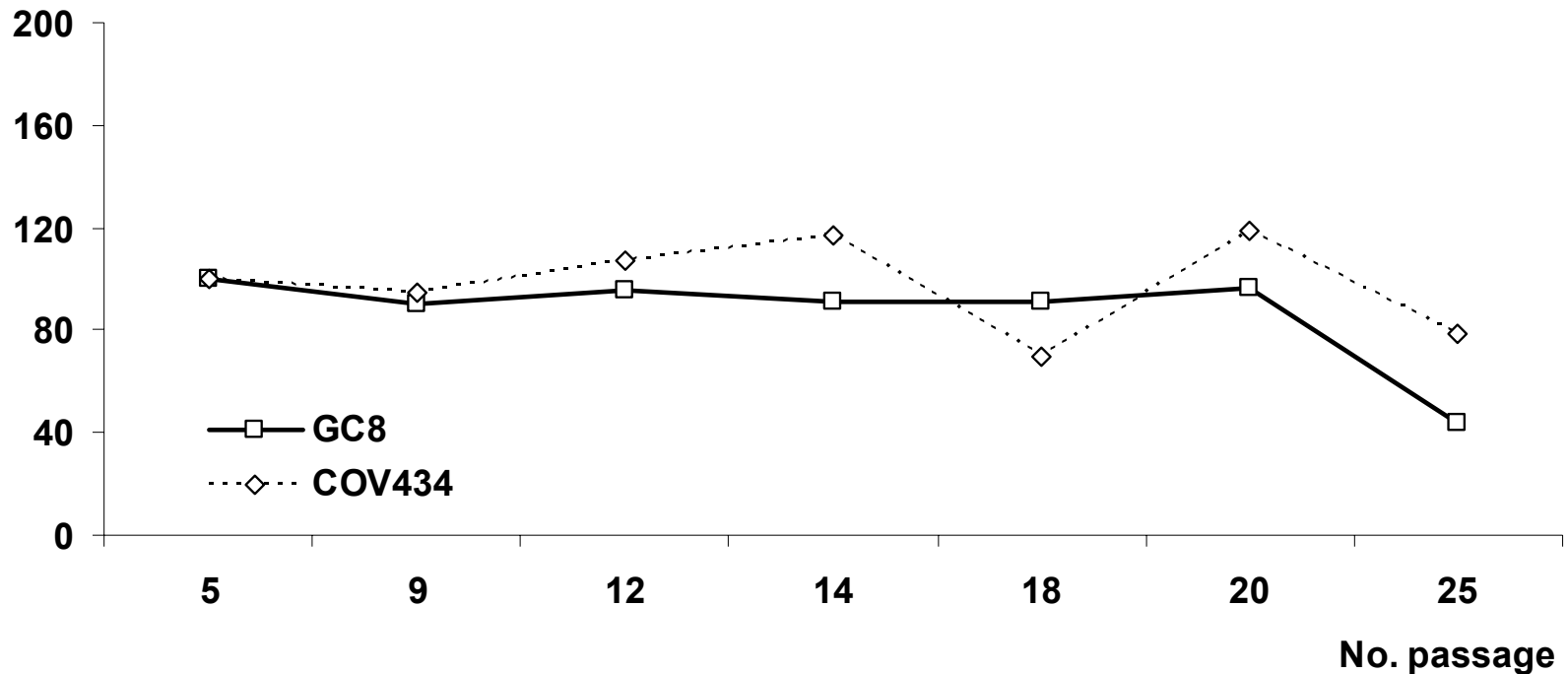
- Stanovení karyotypu GCs v časně pasáži
- GC8 v 5p, 10p, 15p, 20p a 25p
- Normální karyotyp a chromozomální stabilita byla prokázána u všech vzorků !!!
- Byla vyloučena nádorová transformace GCs kultivovaných *in vitro*.



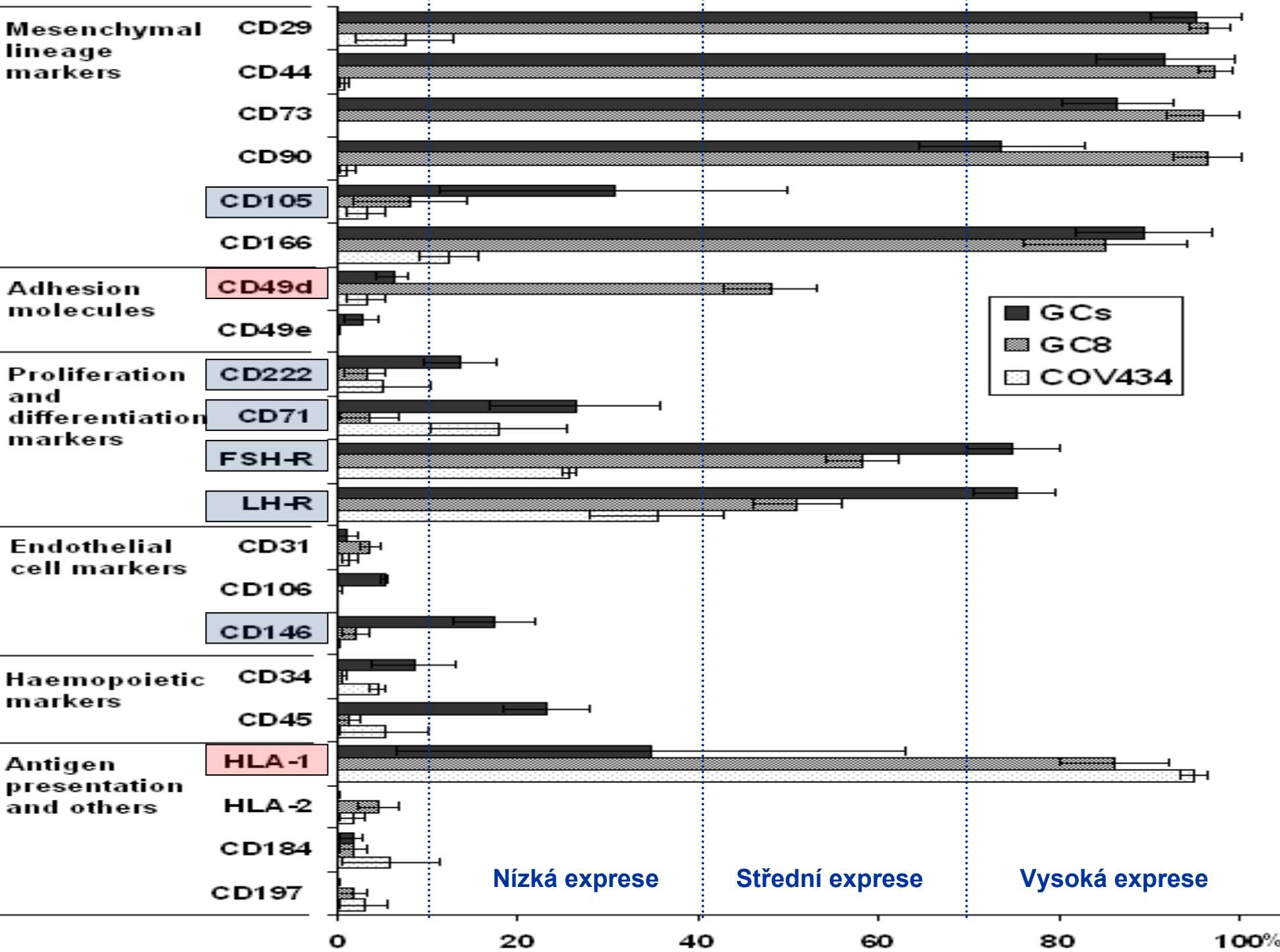
Vzorek GC8 analyzovaný 102. den kultivace v 25. pasáži: bez chromozomálních změn.

Stanovení délky telomer

Sledování trendu změny délky telomer u nádorové linie COV434 a dlouhodobě proliferující linie GCs



GC8 linie - mezi 20. a 25. pasáží došlo k redukci délky telomer !!!



Závěry, diskuse

- Byl vypracován **protokol pro dlouhodobou kultivaci GCs se zachováním proliferace do 9p (45 dnů)**.
- Zaznamenány změny **morfologie** – senescence buněk.
- Analýza trendu **doubling time** a **population doublings**.
- Ověřena **chromozomální stabilita** u všech kultivovaných vzorků.
- Stanoveno **21 znaků** na povrchu GCs a linie COV434.
- Sledována změna **délky telomer** u linie COV434 a GC8.

Poděkování

**Soukup T.¹, Moos J.², Moosova M.³, Pavelkova J.³, Rezabek K.³,
Visek B.¹, Kucerova L.⁴, Mokry J.¹, Micuda S.⁵**

¹ Ústav histologie a embryologie LF UK v HK

² Sigma-Aldrich, Praha

**³ Centrum asistované reprodukce, Gynekologicko-
porodnická klinika 1.LF UK a VFN v Praze**

⁴ Oddělení lékařské genetiky, FN v HK

⁵ Ústav farmakologie LF UK v HK

MSMT 0021620820

MSMT 002162750

IGA MZ č. NS/9781-3



Děkuji za pozornost