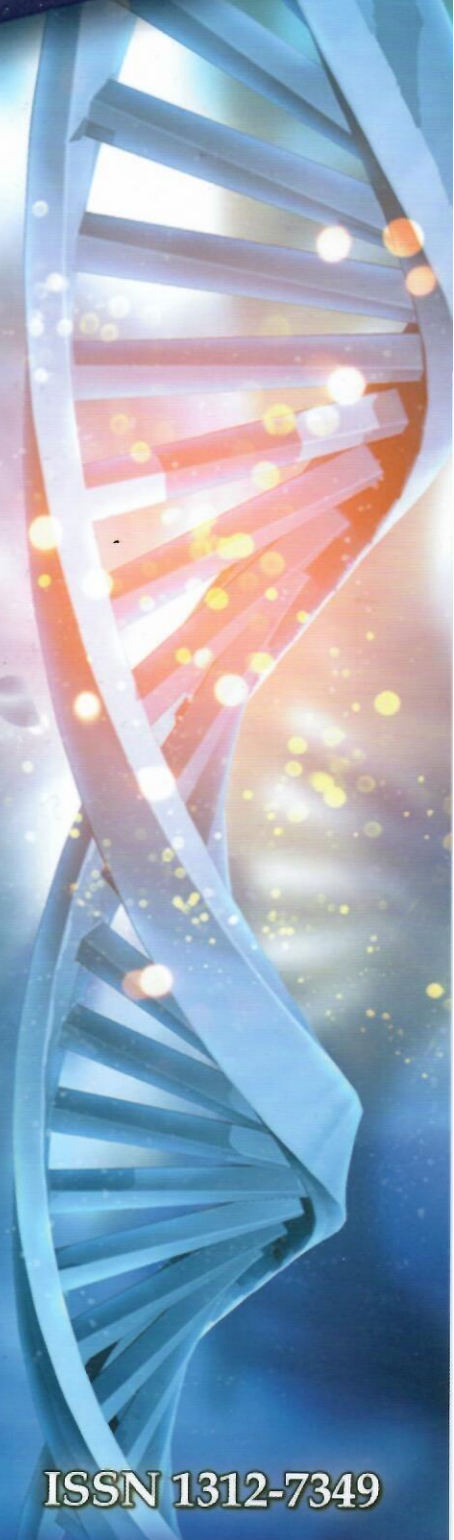
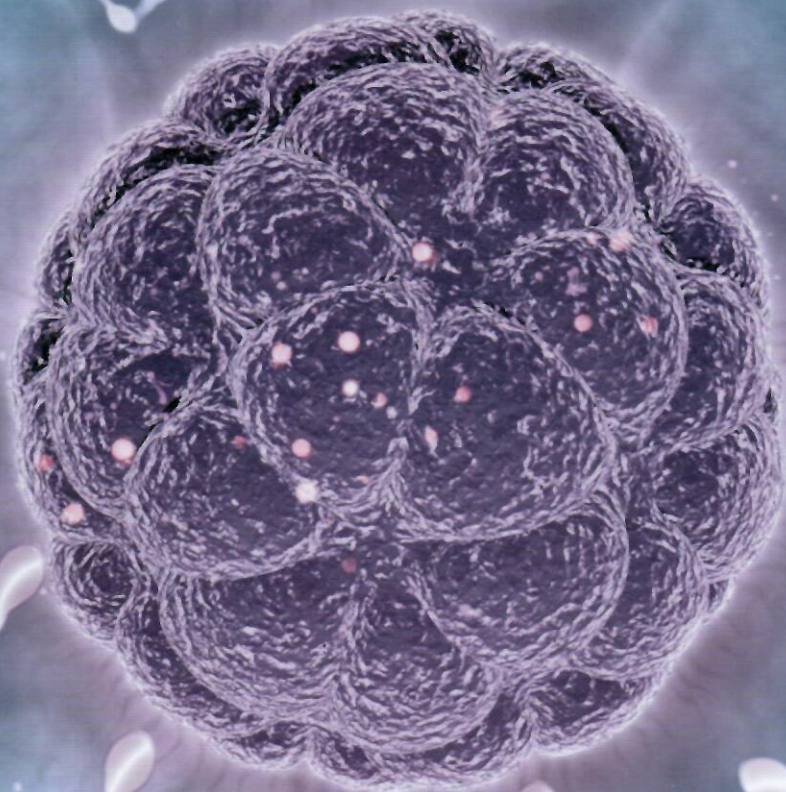


# ЕМБРИОЛОГИЯ

embryology



ISSN 1312-7349

ИЗДАВА БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ  
ПО РЕПРОДУКТИВНА ЧОВЕШКА ЕМБРИОЛОГИЯ

ТОМ 8 КНИЖКА 1  
2018



Настоящият брой на Списание „Ембриология“  
е издаден с финансовата подкрепа на МОН –  
Споразумение ДО1-154/28.08.2018/ (НИКТБ)



# MSD

## INVENTING FOR LIFE

### За MSD България:

MSD развива дейност в България вече повече от 20 години. Още от самото начало MSD България целенасочено работи за осигуряването на достъп до иновативни здравни решения за хората и животните. Усилията ни са концентрирани върху развитието на имуно-онкологията – област с потенциал да се превърне не само в нова парадигма за лечение на рака, но и в нова надежда за по-дълъг и по-доброкачествен живот за пациентите. Като част от дългогодишната си водеща роля в терапията на инфекциозни заболявания MSD България си сътрудничи с научната и пациентската общност за разработване и осигуряване на иновативни решения за подпомагане на хората, живеещи с хроничен хепатит С и HIV. По отношение на профилактиката MSD споделя стремежа към увеличаване броя на ваксинирани лица и предоставя най-широкия възможен достъп в една устойчива рамка, осигуряваща иновативни ваксини за справяне с важни неразрешени здравни нужди. Успоредно с нашата ориентираност към иновациите, ние в MSD продължаваме да работим и по хуманитарни кампании, с които да подпомагаме майчиното здравеопазване, като следваме убеждението, че нито една майка не трябва да умира по време на раждане. Подчертавайки културата ни на корпоративна социална отговорност, всяка година служителите на MSD България полагат стотици часове доброволчески труд за подобряване здравето и благосъстоянието на обществото чрез многобройни дейности в съответствие с дългогодишната глобална политика на компанията. Ние в MSD България се стремим да прилагаме иновативния подход във всекидневната ни работа, като основен наш приоритет е да се превърнем в дигитален лидер в комуникациите ни с външните партньори, с обществото и, в рамките на компанията – между служителите. Посветили сме усилията си да внесем изобретателски дух във всичко, което правим, за да помогнем за подобряване на здравето и благополучието на хората в цял свят – да разширим достъпа до здравеопазване, да работим по етичен начин, да опазваме околната среда и да ангажираме служителите си.

## СЪДЪРЖАНИЕ:

<b>Децидуализацията – естествен механизъм за селекция на човешки предимплантационни ембриони</b>	<b>3</b>
<i>И. Бочев, М. Юнакова</i>	
<b>Участие на интермедиерните филаменти при прехода от герминален везикул към метафаза I на овоцитите</b>	<b>9</b>
<i>С. Делимитрева, В. Николова, И. Чакърова, В. Хаджинешева, Р. Живкова, М. Маркова</i>	
<b>Методи за <i>in-vitro</i> култивиране на овариална тъкан или изолирани фоликули</b>	<b>15</b>
<i>М. Христова, Е. Христова, П. Тодоров</i>	
<b>Новини от мрежата</b>	<b>21</b>
<b>Предстоящи конгресни прояви през 2019 година</b>	<b>26</b>
<b>Научна инфраструктура “Клетъчни технологии в биомедицината” - приоритетен проект в национална пътна карта за научна инфраструктура (2017-2023 г.)</b>	<b>27</b>

## CONTENTS:

<b>Decidualization – a mechanism for natural selection of human preimplantation embryos</b>	<b>3</b>
<i>I. Bochev, M. Yunakova</i>	
<b>Role of the intermediate filaments during the oocyte transition from germinal vesicle to metaphase I</b>	<b>9</b>
<i>S. Delimitreva, V. Nikolova, I. Chakarova, V. Hadzhinesheva, R. Zhivkova, M. Markova</i>	
<b>Methods for <i>in-vitro</i> culture of ovarian tissue or isolated follicles</b>	<b>15</b>
<i>M. Hristova, E. Hristova, P. Todorov</i>	

### Редакционна Колегия

Доц. Пламен Тодоров, дбн – главен редактор  
Д-р Георги Николов – зам. гл. редактор

### Предпечатна подготовка и печат

"Л и Д Тера" ООД  
office@ldtera.eu

### Членове:

Доц. д-р Иван Николов, дм  
Доц. Росица Конакчиева, дбн  
Доц. Янчо Тодоров, дб  
Елена Христова, дб  
Димитър Баров  
чл-кор. Румен Панков, дбн  
д-р Иво Тодоров, дм  
Десислава Тачева, дб  
Диана Гуленова, дб  
д-р Георги Вакрилов

### Чуждестранни членове:

проф. Владимир Исаченко - Германия  
проф. Кристина Магли - Италия  
проф. Вилфред Файхтингер - Австрия  
проф. Анна Вейга - Испания  
проф. Миодраг Стойкович - Сърбия

Уважаеми колеги и читатели,

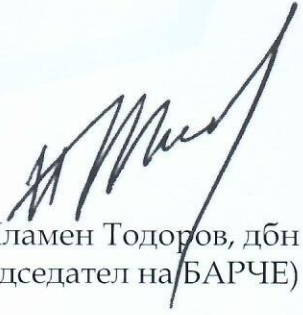
Пред вас е поредният брой на списание „Ембриология“ – издание на Българската асоциация по репродуктивна човешка ембриология (БАРЧЕ). За изминалите 13 години от създаването си Асоциацията продължи да укрепва и разширява дейността си и се превърна в търсен партньор при изготвянето на нормативната база за регулиране и финансиране на асистираната репродукция в България. Организираните бяха редица конгресни прояви и обучителни курсове за ембриолози, в които взеха участие водещи чуждестранни специалисти – проф. Анна Вейга, д-р Кристина Егуизабал, проф. Миодраг Стойкович, проф. Мейлинда Лако, проф. Владимир Исаченко и др. За нас е чест, че един от нашите чуждестранни членове – проф. Кристина Магли тази година бе избрана за Председател на Европейската асоциация по човешка репродукция и ембриология (ESHRE). Доказателство за нарасналия авторитет на БАРЧЕ е и фактът, че с решение на правителствено ниво нашата асоциация е включена в Националната инфраструктура за научни и приложни изследвания в областта на биологията и медицината в България за периода 2017-2023 г.

В последно време както в страната, така и в световен мащаб се увеличава броят на процедурите по асистирана репродукция. Обучението на млади и перспективни специалисти добива особено голямо значение. Наред с проведените курсове, през изминалата година с финансовата подкрепа на фирма IVD организирахме конкурс за млади ембриолози, победителите от който специализираха в европейски ин-витро центрове. Планираме и тази година да продължим традицията.

Продължава международната сертификация на ембриолози, организирана от ESHRE. Тази година още четирима наши колеги издържаха успешно изпита, с което броят на българските ембриолози с европейски сертификати нарасна на тридесет. Десет от тях притежават документ за главен ембриолог (Senior Clinical Embryologist). Радващ е и фактът, че няколко наши колеги успешно защитиха докторски дисертации в областта на репродуктивната медицина и стволовите клетки. Наблюдава се и увеличена публикационна активност от страна на българските ембриолози, включително в реномирани западни издания.

Списание „Ембриология“ има своята роля за популяризиране дейността на БАРЧЕ и обмена на информация в рамките на колегията. В този аспект апелирам за повече активност при предлагането на оригинални статии и обзори, случаи от практиката (case-report), мнения за научни постижения и възможности за практическото им приложение и др., което несъмнено ще допринесе за издигане авторитета на списанието.

Използвам възможността да благодаря на фирмите, които подпомагат дейността на БАРЧЕ и да пожелаая здраве и успехи на всички колеги!

  
Доц. Пламен Тодоров, дбн  
(Председател на БАРЧЕ)

# ДЕЦИДУАЛИЗАЦИЯТА – ЕСТЕСТВЕН МЕХАНИЗЪМ ЗА СЕЛЕКЦИЯ НА ЧОВЕШКИ ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННИ ЕМБРИОНИ

И. Бочев, М. Юнакова  
САГБАЛ „Д-р Щерев“, София

## DECIDUALIZATION – A MECHANISM FOR NATURAL SELECTION OF HUMAN PREIMPLANTATION EMBRYOS

I. Bochev, M. Yunakova  
Ob/Gyn Hospital “Dr. Shterev”, Sofia

**Резюме:** Децидуализацията, протичаща през секреторната фаза на менструалния цикъл е процес, с който се означава морфологичната и биохимична трансформация на ендометриалните стромални фибробласти в специализирани секреторни децидуални клетки. Според скорошни проучвания, децидуализацията се ендометриум изпълнява ролята на естествен биосензор, който, в зависимост от характера на постъпващите ембрионални сигнали, или благоприятства по-нататъшното развитие или индуцира отхвърлянето на хромозомно абнормални и нежизнеспособни ембриони. Освен това, нарушената децидуализация на човешките ендометриални стромални клетки, както и отсъствието на селективност към имплантиращия се ембрион са силно асоциирани с повтарящи се загуби на бременността.

**Abstract:** Decidualization begins in the secretory phase of the menstrual cycle and represents a process of profound morphological and biochemical transformation of endometrial stromal fibroblasts into specialized secretory decidual cells. Recent studies have shown that decidualizing endometrium serves as a natural biosensor that responds to embryonic signals in a manner that either supports further development or leads to a rapid disposal of chromosomally aberrant and poorly viable embryos. Furthermore, aberrant decidualization of human endometrial stromal cells and lack of embryo selection are strongly associated with recurrent pregnancy loss.

Вероятността за постигане на бременност при човека в рамките на един менструален цикъл е едва около 25%, което е един от най-ниските показатели сред бозайниците [1]. Това до голяма степен се определя от факта, че една значителна част (30%) от ранните ембриони не достигат до имплантация (предимплантационни загуби), а други 30% отпадат преди шеста гестационна седмица (пре-клинична / биохимична бременност) [2]. Освен това, приблизително 10% от клиничните бременности завършват с неуспех до 12 г.с., което определя ранните спонтанни аборти като най-често срещаното усложнение по време на бременността.

Възприето е схващане, според което тази изключително висока честота на ранните спонтанни аборти се обуславя преди всичко от съчетанието на следните две ключови характеристики на човешките ембриони, а именно свойствената им инвазивност, от една страна, и високата инцидентност на хромозомни аномалии, от друга.

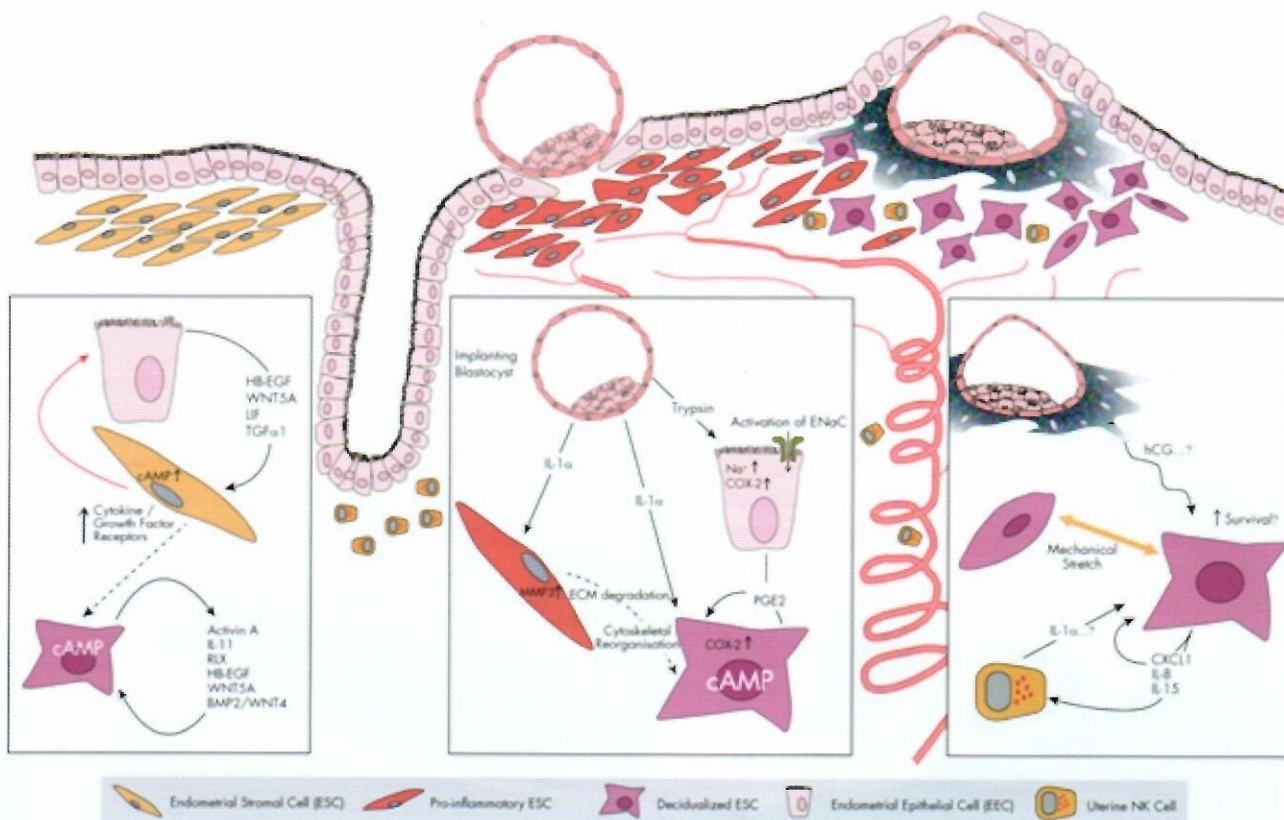
При около 70% от бластомерите, изолирани от ембриони с високо качество и подложени на цялостен геномен скрининг, е установено

наличието на комплексни хромозомни аномалии, дължащи се най-вече на митотични, отколкото на мейотични нарушения в хромозомното разделяне [3,4]. Що се отнася до ембрионите на стадий бластоцист, с помощта на геномен хибридизационен анализ са идентифицирани общо над 1100 различни форми на анеуплоидия при 58% от анализиранияте ембриони [5]. Като цяло е доказано, че едва 10% от предимплантационните ембриони при фертилни жени на възраст под 35 г. притежават нормален кариотип във всички бластомери, докато останалите се характеризират с нееднороден хромозомен състав и висока степен на мозаицизъм [4]. Значителен дял от типичните за бластоцистния стадий хромозомни аберации никога не са били регистрирани в проби от абортивен материал [5], което предполага, че засегнатите ембриони или не успяват да се имплантират, или са отхвърлени скоро след проникването им в луминалния ендометриален епител [6,7,8]. Тези факти, както и наблюдението, че не всички хромозомни аномалии водят до компрометиране жизнеспособността и имплантационния потенциал на човешките ранни ембриони, предполагат съществуването на естествени механизми, превентиращи зачеването и по-нататъшно развитие на инвазивни, но

потенциално абнормални ембриони. Изложените през последните години в редица публикации експериментални данни показват, че спонтанната децидуализация на ендометриума, в съчетание с цикличните фази на менструация и регенерация, представляват основен фактор в предпазването от безперспективна имплантация, което, от своя страна, дава нов поглед върху патологичните механизми, обуславящи повтарящите се спонтанни аборти.

Ендометриалната децидуализация е процес, необходим за бременността при всички видове с инвазивна плацента, който се характеризира с

трансформация на стромалните фибробласти в специализирани секреторни децидуални клетки. Те, от своя страна, са с решаващ принос за формирането на благоприятна хранителна и същевременно имунотолерантна среда, задължителна за успешната имплантация и последващото развитие на плацента. За разлика от повечето бозайници, децидуализацията на човешкия ендометриум не изисква присъствието на ембрион, а се инициира в отговор на ендокринни сигнали по време на средния период от лутеалната фаза на менструалния цикъл [Фиг. 1].



Фиг. 1. Децидуализация на ендометриума. Веднъж инициран, процесът на децидуализация се контролира и поддържа от цитокини и растежни фактори, продуцирани от различните клетъчни елементи на ендометриума като епителни, стромални и локални имунни клетки. Gellersen and Brosens, *Endocrine Reviews*, 2014 [11]

Първите доказателства в подкрепа на концепцията за активна и същевременно селективна функция на децидуата по отношение на имплантиращите се ембриони, са получени от редица изследвания, включващи ко-култивиране на човешки бластоцисти върху монослой от децидуализирани ендометриални стромални клетки (ЕСК). Първоначално е установено, че трофобластната инвазия е в пряка зависимост от миграционния потенциал на децидуалните клетки, като потискането на сигналните пътища, регулиращи тяхната подвижност, цитоскелетна реорганизация и фокалната адхезия, напълно компрометира бластоцистната експанзия [12,13].

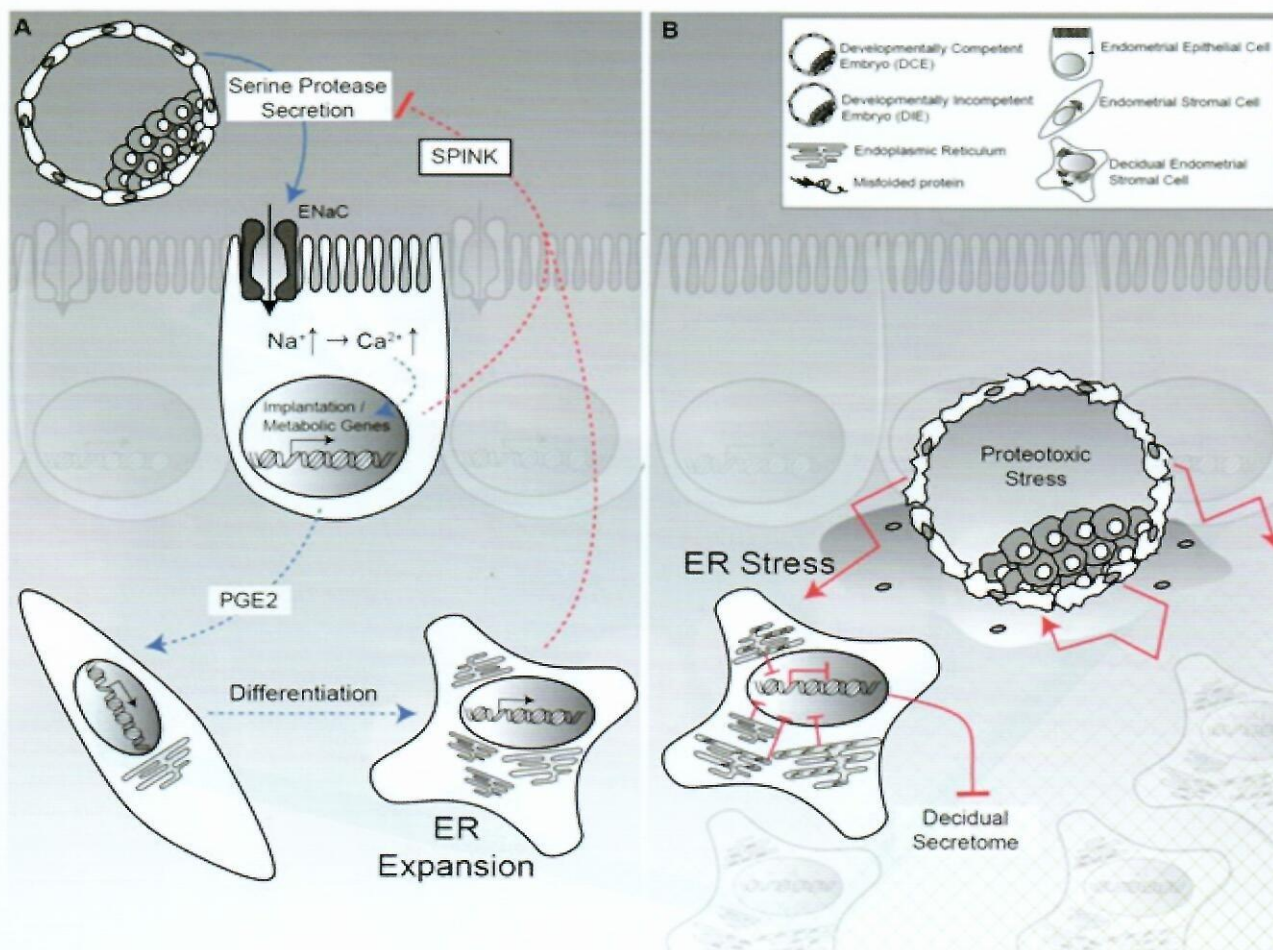
Допълнителни проучвания са показали, че миграционните и инвазивни способности на ендометриалните стромални клетки съществено се повишават в процеса на тяхната децидуализация, като достигат своя максимум в отговор на паракринни сигнали с трофобластен произход [14]. Всичко това предполага значително по-динамично поведение на децидуалните клетки при досег с предимплантационния ембрион, за разлика от доскоро възприеманата им за напълно пасивна роля в рамките на класическата концепция за протичането на имплантационния процес. Съгласно нея, успешно навлезлият в луминалния епител бластоцист продължава

своето активно проникване навътре в механично инертния децидуален матрикс. В действителност, вместо да бъдат инвазирани, децидуалните клетки активно „поглъщат“ и „капсулират“ ембриона, факт, който е допълнително потвърден от хистологичните и ултразвукови находки в зоните на имплантацията.

Чрез използване на сходна експериментална постановка с ко-култивиране на човешки ембриони в бластоцистен стадий върху слой от предварително децидуализирани ЕСК са получени данни за съществени изменения в профила на продуцираните от стромалните клетки ключови цитокини и растежни фактори. Нещо повече, характерът на този отговор от страна на децидуализираните клетки е в разрез с предварителните, основани на господстващата ембрио-центрична парадигма, предвиждания. Вместо очаквания стимулиращ секреторен ефект, присъвянето на жизнеспособни и оценени като най-перспективни ембриони на практика не повлиява продукцията на нито един от изследваните (14 на брой) проимплантационни фактори, сред които IL-1 $\beta$ , HB-EGF и LIF. За разлика от това бластоцистите със занижени

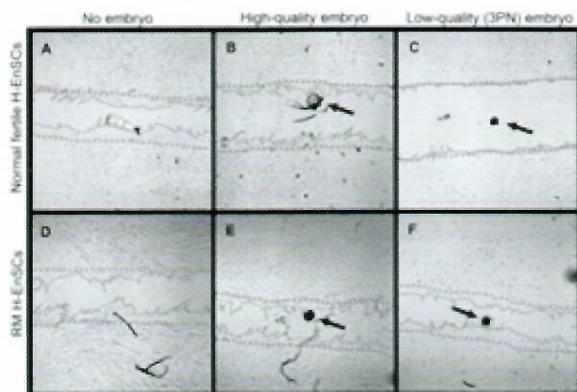
морфокинетични параметри предизвикват засилена реакция при децидуализираните ЕСК, изразяваща се в селективно инхибиране секреторната на цитолините IL-1 $\beta$ , -6, -10, -17, -18, а също и на eotaxin (CCL11) и HB-EGF. Установено е също така, че тази предполагаема биосензорна функция по отношение качеството на ембриона е присъща само за децидуалния клетъчен фенотип, тъй като подобен ефект не се наблюдава при контролните недиференцирани ЕСК [15].

Наблюдението, че единствено некачествените ембриони провокират изменения в секреторната активност на децидуализирания ендометриум е в съгласие с по-ранни публикации [16], според които здравите ембриони, нуждаещи се единствено от енергия за своето развитие, са метаболитно „тихи“, в сравнение с по-нежизнеспособните ембриони, проявяващи допълнителна активност за самопречистване от увредени участъци и апоптоза. Т.е. по-неперспективните и, съответно, метаболитно активни ембриони са източник на предполагаеми сигнали, на които ендометриалната строма реагира чрез потискане експресията на необходимите за имплантацията гени.



Фиг. 2. Механизми на активна позитивна и негативна селекция на човешки ембриони по време на имплантация. *Brosens et al., Scientific Reports, 2014* [17]

Според последни проучвания, склонността на децидуализираните ЕСК към миграционна активност се проявява единствено спрямо човешки ембриони с високо качество и е изцяло потисната в присъствието на хромозомно абнормални трипронуклеарни бластоцисти [18] [Фиг. 3]. Насоченото движение на ембриона е предизвикано от химичен градиент, формиран от специфични хемоатрактанти, секретирани от трофектодермалните клетки. Най-съществена в това отношение е ролята на тромбоцитния растежен фактор (PDGF-AA), наличието на рецептори за който е потвърдено при ендометриалните клетки [19].



Фиг. 3. In vitro модел на зоната на контакт между децидуализирани човешки ендометриални стромални клетки (H-EnSCs) и човешки ембриони. (A-C) - H-EnSCs, получени от фертилни донори; (D-F) - H-EnSCs, изолирани от жени с повтарящи се спонтанни абортти. Взаимодействие между H-EnSCs и ембриони с добро (B и E) или лошо (C и F) качество; (A и D) - H-EnSCs при отсъствие на човешки ембрион. Weimar et al., PLoS One, 2012 [18]

Взети заедно, изложените дотук данни дават достатъчно основание цикличната децидуализация при човека да бъде възприемана като процес, благодарение на който ендометриумът придобива способността да „капсулира“ имплантиращия се зародиш, да извършва качествен контрол и при необходимост да отстранява ембриони с компрометирана жизнеспособност посредством индуциране на подобна на менструацията реакция.

Хипотезата за селективната биосензорна функция на децидуализирания ендометриум предполага, че евентуални нарушения в процеса на децидуализация и произтичащата от тях невъзможност за възприемане на ембрионалните сигнали, би довела до безпрепятствена имплантация на компрометирани ембриони и, като следствие, до повишена вероятност от преждевременна загуба на бременността. Наличието на положителна корелация между броя на поредните спонтанни абортти и честотата

на забременяване е потвърдено в серия клинични проучвания. Така например е установено, че при 40% от жените с повтарящи се спонтанни прекъсвания на бременността, интервалът между две последователни зачевания е в рамките на 3 месеца (състояние на свръх фертилитет), като най-скъсен е при тези от тях с 5 или повече абортта. В друго изследване, акцентиращо върху ролята на ендометриалната рецептивност, се съобщава за рязко повишаване на риска от ранен аборт при настъпване на бременност извън времевите рамки на имплантационния прозорец. Например, изместване на имплантацията само с два дни води до увеличаване на вероятността за аборт с до 70% [20].

Посочените клинични наблюдения ясно показват, че както неограничената рецептивност на ендометриума, така и отсъствието на адекватна ембрио селекция, биха могли да допринесат за последвалата загуба на бременност. Нагледен пример в това отношение са и резултатите от проведените и описани по-горе in vitro изследвания върху миграционното поведение на децидуализирани ЕСК в присъствие на човешки бластоцисти. Съгласно получените данни, ембрионите с нисък потенциал не предизвикват характерното в подобни случаи миграционно инхибиране на ЕСК, ако последните са с произход от жени с повтарящи се спонтанни абортти [18]. Това показва, че именно нарушената децидуализация на ЕСК е най-вероятната причина за свръхрецептивността на ендометриума, продиктувана от неспособността му да упражни пълноценен качествен контрол върху имплантиращия се ембрион.

Съществен принос в подкрепа на гореизложената теза имат проучванията върху експресията на маркерните гени prokineticin-1 (PROK1) и prolactin (PRL) в биопсии от ендометриална тъкан в секреторна фаза при жени с три или повече последователни спонтанни абортта. PROK1 е идентифициран като ключов регулатор на ендометриалната рецептивност [21], а PRL е маркер, който в ендометриума се експресира единствено от децидуализирани ЕСК [10]. Според представените резултати, в ендометриалните проби от жени с повтарящи се абортти експресията на PRL е почти напълно потисната, докато нивата на PROK1, напротив, са силно завишени. Тези данни изцяло се потвърждават от аналогични изследвания с подложени на in vitro децидуализация култури от ЕСК, получени от пациенти с поне три поредни загуби на бременността [2].

От всичко изложено дотук може да се заключи, че спонтанната децидуализация на човешкия ендометриум се явява ефективен биосензорен



механизъм, който благодарение на способността си да отдиференцира здрави от генетично увредени ембриони, гарантира имплантацията само на тези от тях, чиито потенциал и жизнеспособност са съвместими с развитието на успешна бременност. От друга страна, нарушения в децидуализацията са причина за рязко повишаване на ендометриалната рецептивност за сметка на селективността, което

е типично явление при пациенти с едновременно висока честота на забременяване и повтарящи се спонтанни аборти.

**Адрес за кореспонденция:**

**Иван Бочев, дб**

САГБАЛ „Д-р Щерев“

София 1330, ул. „Христо Благоев“ №25-31

lakatush@yahoo.com

#### **Литература**

1. George K, Kamath MS. Fertility and age. *J Hum Reprod Sci* 2010, (3): 121-123
2. Salker M, Teklenburg G, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanepong T, Mardon HJ, Lokugamage AU, Rai R, Landles C, Roelen BA, Quenby S et al. Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PLoS One* 2010, 5: e10287
3. Mertzaniidou A, Wilton L, Cheng J, Spits C, Vanneste E, Moreau Y, Vermeesch JR, Sermon K. Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Hum Reprod* 2013, 28: 256-264
4. Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, Debrock S, Amyere M, Vikkula M, Schuit F, Fryns JP, Verbeke G et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009, 15: 577-583
5. Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Jaroudi S, Sarasa J, Enciso M, Wells D. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum Genet* 2013, 132: 1001-1013
6. Macklon NS, Geraedts JP, Fauser BC. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update* 2002, 8: 333-343
7. Quenby S, Vince G, Farquharson R, Aplin J. Recurrent miscarriage: a defect in nature's quality control? *Hum Reprod* 2002, 17: 1959-1963
8. Rajcan-Separovic E, Diego-Alvarez D, Robinson WP, Tyson C, Qiao Y, Harvard C, Fawcett C, Kalousek D, Philipp T, Somerville MJ, Stephenson MD. Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2010, 25: 2913-2922
9. Brosens JJ, Parker MG, McIndoe A, Pijnenborg R, Brosens IA. A role for menstruation in preconditioning the uterus for successful pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2009, 200: 615-616
10. Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med* 2007, 25: 445-453
11. Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic decidualisation of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev* 2014, 35 (6): 851-905
12. Grewal S, Carver J, Ridley AJ, Mardon HJ. Human endometrial stromal cell Rho GTPases have opposing roles in regulating focal adhesion turnover and embryo invasion in vitro. *Biol Reprod* 2010, 83(1): 75-82
13. Grewal S, Carver JG, Ridley AJ, Mardon HJ. Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105: 16189-16194
14. Gellersen B, Reimann K, Samalecos A, Aupers S, Bamberger AM. Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals. *Hum Reprod* 2010, 25: 862-873
15. Teklenburg G, Salker M, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanepong T, Mardon HJ, Lokugamage AU, Rai R, Landles C, Roelen BA, Quenby S et al. Natural selection of human embryos: decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation. *PLoS One* 2010, 5: e10258
16. Leese HJ. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *Bioessays* 2002, 24: 845-849
17. Brosens JJ, Salker MS, Teklenburg G, Nautiyal J, Salter S, Lucas ES, Steel JH, Christian M, Chan Y, Boomsma CM, Moore JD, Hartshorne GM et al. Uterine selection of human embryos at implantation. *Sci Rep* 2014, 4:3894
18. Weimar CH, Kavelaars A, Brosens JJ, Gellersen B, de Vreeden-Elbertse JM, Heijnen CJ, Macklon NS. Endometrial stromal cells of women with recurrent miscarriage fail to discriminate between high- and low-quality human embryos. *PLoS One* 2012, 7: e41424
19. Haoouzi D, Dechaud H, Assou S, Monzo C, de Vos J, Hamamah S. Transcriptome analysis reveals dialogues between human trophoblast and endometrial cells during the implantation period. *Hum Reprod* 2011, 26: 1440-1449
20. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999, 340: 1796-1799
21. Evans J, Catalano RD, Brown P, Sherwin R, Critchley HO, Fazleabas AT, Jabbour HN. Prokineticin 1 mediates fetal/maternal dialogue regulating endometrial leukemia inhibitory factor. *FASEB J* 2009, 23: 2165-2175

# биосистеми

Лабораторно оборудване, реактиви и консумативи

Специализирани продукти за IVF

Медицински изделия

**eppendorf**

 **SYNGA**  
Touching life gently

 **Microtech**

**ESCO** MEDICAL  
Life has begun



**проген**

Химически и ДНК експертизи

ДНК ЕКСПЕРТИЗИ: определяне на  
бащинство/майчинство, биологично  
родство, идентификация

ХИМИЧЕСКИ ЕКСПЕРТИЗИ: наркотични и  
упойващи вещества

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДИРАНЕ НА  
МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧНИ МЕТОДИ

## Биосистеми ООД

бул."Ботевградско шосе"№247,

Сграда 1,София

тел.: 0884 163 814

[office@biosystems.bg](mailto:office@biosystems.bg)

[www.biosystems.bg](http://www.biosystems.bg)

## Проген ООД

бул."Ботевградско шосе"№247,

Сграда 1,София

тел.: 0888 064 64

[labprogene@mbox.contact.bg](mailto:labprogene@mbox.contact.bg)

<http://progene.my.contact.bg>

## УЧАСТИЕ НА ИНТЕРМЕДИЕРНИТЕ ФИЛАМЕНТИ ПРИ ПРЕХОДА ОТ ГЕРМИНАЛЕН ВЕЗИКУЛ КЪМ МЕТАФАЗА I НА ОВОЦИТИТЕ

С. Делимитрева, В. Николова, И. Чакърова, В. Хаджинешева, Р. Живкова, М. Маркова  
Медицински университет – София, катедра Биология

### ROLE OF THE INTERMEDIATE FILAMENTS DURING THE OOCYTE TRANSITION FROM GERMINAL VESICLE TO METAPHASE I

S. Delimitreva, V. Nikolova, I. Chakarova, V. Hadzhinesheva, R. Zhivkova, M. Markova  
Medical University – Sofia; Department of Biology

**Резюме:** Последните етапи на мейозата на ооцитите включват разпадане на ядрената обвивка (известно в ембриологията като GVBD) и преход към метафаза. Този процес е свързан с пренареждане на хроматина, направлявано от елементите на цитоскелета. Докато тубулиновите и актиновите цитоскелетни структури на зреещия овоцит са добре проучени, данните за интермедиерните филаменти (ИФ) са ограничени. В настоящото изследване анализирахме локализацията и пренареждането на цитоплазмените ИФ в миши овоцити чрез имуноцитохимични техники. Резултатите показаха, че те са локализиращи в овоцитния кортекс и са асоциирани с ядрената обвивка, времето и уплътнените хромозоми. По време на прехода GVBD-метафаза връзката на ИФ с кортекса отслабва, като те се концентрират около метафазния хроматин. Разположението на ИФ се припокрива с фибриларния актин, но за разлика от него, те се свързват и с метафазния хроматин. ИФ освен това са съсредоточени в периферията на кумулусните клетки и в техните транс-зонални мостчета, които ги свързват с овоцита.

**Abstract:** The final stages of oocyte meiotic maturation include nuclear envelope breakdown (in embryology known as GVBD) and transition to metaphase. This process is related to chromatin reorganisation mediated by cytoskeletal elements. Whereas the dynamics of tubulin and actin cytoskeletal structures in maturing oocyte are well studied, data about the intermediate filaments (IF) are still insufficient. In the present study, we analysed the localisation and rearrangement of cytoplasmic IF in mouse oocytes by immunocytochemical techniques. Our results showed that IF are positioned in the oocyte cortex and associated with the nuclear envelope, spindle and condensed chromosomes. During GVBD-metaphase transition, they relax their connection to the cortex, and at the same time concentrate around the metaphase chromatin. Their localization overlaps with fibrillar actin, except for the IF connection with metaphase chromatin. The IF were also concentrated in the periphery of cumulus cells and in their trans-zonal bridges that connect them to the oocyte.

#### Въведение:

Процесът на матурация на овоцитите започва в профаза I и завършва в метафаза II, когато те са готови за оплождане. За механиката на процеса са отговорни цитоскелетните системи: съставеното от микротубули мейотично вретено, което извършва хромозомната сегрегация, и мрежата от микрофиламенти, която го задържа в правилна позиция и осъществява отделянето на полярните телца. Пренареждането на цитоскелета се индуцира и контролира от хромозомите.

Сглобяването на микротубулите в делително вретено е много по-различно от това в соматичните клетки и сперматоцитите. Тази особеност се дължи на липсата на центриоли в овоцита след пахитен<sup>[1]</sup>. На стадий GVBD (germinal vesicle breakdown), когато цитоплазмата вече свободно достига до хромозомите, в близост с тях се формират множество малки звезди от микротубули, които в последствие образуват двуполусно вретено<sup>[2,3]</sup>.

Докато в яйцеклетката все още се наблюдава интактно ядро, микрофиламентите (фибриларен актин) са съсредоточени предимно в тънък мрежовиден слой под клетъчната мембрана и около него<sup>[4,5]</sup>. След разпадането на ядрената обвивка, перинуклеарната микрофиламентна мрежа се запазва и загражда хромозомите и оформящото се мейотично вретено<sup>[6]</sup>. Както при всяка друга цитокинеза, микрофиламентите имат за задача да разделят дъщерните клетки една от друга, а в случая – да отделят полярното телце от овоцита. За целта, около екватора на мейотичното вретено се формира контрактилен актинов пръстен. За да може обемът на цитоплазмата на полярното телце да е минимален, вретеното трябва да бъде разположено периферно. За да се постигне това, първоначално образуваното в центъра на яйцеклетката вретено мигрира към мембраната, теглено от микрофиламенти, разполага се в кортекса и остава там до края на мейозата<sup>[4]</sup>. Процесът се нарича „закотвяне“, защото то остава прикрепено към кортекса

до настъпване на оплождане и е следствие на натрупването на фибриларен актин в кортикалната зона, разположена над вретеното. Този концентриран актин се нарича актинова шапка<sup>[7,8]</sup>.

Докато участието на микрофиламентите и микротубулите в пренареждането на овоцитния хроматин е добре изяснено, ролята на третия вид цитоскелетни елементи – интермедиерните филаменти (ИФ), засега е слабо проучено. Дори според някои изследвания в овоцитите те изобщо липсват. В последните години обаче няколко работни групи установяват наличие на ИФ в овоцити на бозайници чрез имуноцитохимични техники.

ИФ са нишки с диаметър около 10 nm. Те биват цитоплазмени и ядрени. Ядрените участват при изграждането на ядрената ламина (ламини) и поддържането на общата организация на ядрото. Главната роля на цитоплазмените ИФ е да придават механична здравина на животинските тъкани<sup>[9,10]</sup>. Съставът им варира и зависи от типа на клетката. Най-разпространените и добре изучени белтъци на цитоплазмените ИФ са кератините (цитокератините) в епителните клетки и виментинът в клетките от мезенхимен произход<sup>[11]</sup>.

Овоцитното зреене изисква тясно взаимодействие с фоликулните клетки, което също се опосредства от цитоскелета. В кумулусните клетки са открити както цитокератини, така и виментин, но организацията им все още не е добре изучена. Докато е на стадий GV (т.е. блокиран в диктиат), овоцитът е свързан с голям брой заобикалящи го фоликулни клетки, чиито цитоплазмени израстъци пронизват зона pellucida и достигат мембраната му. На нивото на зоната те са изключително тънки (диаметър под 1  $\mu\text{m}$  или микрометър), но при достигане на оолема образуват разширение. След възобновяването на мейозата тези междуклетъчни контакти започват да се прекъсват. Броят на израстъците прогресивно намалява и на етап метафаза II те рядко се наблюдават<sup>[12]</sup>. Така зреенето започва при тясно взаимодействие на овоцита с близките фоликулни клетки, но с напредване на овогенезата връзката отслабва и зрялото яйце е изолирано от околната тъкан.

Важна особеност на животинския цитоскелет е тясната връзка между микротубулите и ИФ<sup>[13,14]</sup>. По правило цитоплазмените ИФ се опират върху тях. ИФ са свързани и с актиновия цитоскелет<sup>[14]</sup>, макар и не толкова тясно, колкото с микротубулите. Една от причините за това е, че ИФ се организират най-вече около ядрото,

докато повечето функции на микрофиламентите изискват свързването им с клетъчната мембрана, поради което значителна част от актиновите филаменти в клетката се намират непосредствено в кортекса. Въпреки това поне в някои случаи те направляват изграждането на цитокератиновите. Целта на настоящото изследване беше да се докаже наличие на цитоплазмени ИФ в миши овоцити и да се проследят промените в тяхната локализация при прехода от GVBD до метафаза I на мейозата.

#### *Материали и методи:*

Като източник на овоцити бяха използвани женски лабораторни мишки от линия BALB/c. Всички експерименти с тях бяха предварително одобрявани от Комисията по етика на научните изследвания към МУ – София. Мишките се подлагаха на овариална стимулация с 5 IU хормон с фоликуло-стимулиращо действие и 48 часа по-късно с 5 IU хормон с лутеинизиращо действие (Pregnyl, Organon). Животните бяха евтаназирани 16-18 часа след втората стимулация. Яйцепроводите бяха отпрепарирани и поставяни в петри с хранителна среда на Leibovitz (Sigma – Aldrich) със следните добавки: 3 mg/ml BSA; 2,5 mg/ml трансферин; 2,5 mg/ml инсулин. Чрез спукване на ампулите на яйцепроводите бяха получавани зрели овоцити и овоцит-кумулусни комплекси. Тубулинът беше визуализиран чрез непряка имуноцитохимична реакция с моноклонално анти  $\alpha$ -тубулиново мише IgG анти тяло (0,5 $\pm$ 1  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma) и FITC-анти-миши IgG конюгат (Sigma). Актинът и ДНК бяха визуализирани чрез специфичното им свързване съответно с фалоидин-TRITC (1  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma) и HOECHST 33258 (10  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma). Цитокератините бяха визуализирани чрез непряка имуноцитохимична реакция с моноклонално анти-пан-цитокератиново мише IgG1 анти тяло (0,5 $\pm$ 1  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma) и FITC-анти-миши IgG конюгат (Sigma), а виментинът чрез моноклонално анти-виментиново мише IgM анти тяло (0,5 $\pm$ 1  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma) и FITC-анти-миши IgG, IgA и IgM конюгат (Sigma). След това яйцеклетките бяха включвани в Polyvinyl alcohol (Fluka, Германия) и прехвърляни на предметни стъкла. Подробно методът е описан от Delimitreva et al., 2006<sup>[15]</sup>. За отчитане на резултата беше прилагана флуоресцентна микроскопия (Axioskop 200, Zeiss, Гьотинген, Германия).

#### *Резултати:*

Чрез имунофлуоресценция бяха локализирани цитокератини 1, 5, 6 и 8 и виментин. При това беше установено наличие и пълна колокализация на двата типа белтъци на ИФ, поради което реакцията за тях ще бъде описвана общо. В овоцитите на стадий GV се наблюдаваше

положителна реакция за цитокератини и виментин в два клетъчни компартмента – непосредствено под оолемата и областта на ядрото. На етап ранен GV асоциираната с ядрото реакция беше ограничена в неговата периферия. На малко по-късен фаза – GV с оформена кариосфера, кондензираният хетерохроматин в нейната периферия също реагираше за белтъците на цитоплазмените ИФ. GV-овоцитите, които не бяха специално обработени за пълно отстраняване на кумулуса, по правило бяха заобиколени от кумулусни клетки, в които също се откриваха изследваните белтъци на цитоплазмените ИФ. На стадий метафаза I виментинът и цитокератините отново показаха асоциация с клетъчната периферия, от една страна, и с ядрения материал (хромозомите), от друга. Относителната интензивност на реакцията обаче бе променена, като в кортикалната област беше отслабнала, а в близост до метафазната пластинка беше засилена. Единственият периферен участък с все още интензивна реакция беше шапката. Под нея се наблюдаваше натрупване на ИФ, свързано със самите хромозоми и около мейотичното вретено, без обаче да се белязват самите нишки. Повечето метафазни овоцити при подготовката за микроскопиране бяха останали без кумулус и се наблюдаваха изолирани.

Предвид на положителната реакция за цитоплазмени ИФ в кортикалната цитоплазма на овоцита и особено в шапката над мейотичното вретено – участъци, известни с добре развития си актинов цитоскелет, бе проведена успоредна локализация на ИФ, от една страна, и фибриларен актин, от друга. Беше установена значителна, но не пълна колокализация. В кортикалния слой реакцията за двете групи цитоскелетни компоненти беше идентична, но в областта на ядрото и хромозомите се откриваха разлики. При незрелите овоцити на стадий GV белтъците на цитоплазмените ИФ показваха много по-силна склонност от актина да се асоциират с герминалния везикул. При метафазните овоцити около мейотичното вретено се наблюдаваше светене както за ИФ, така и за актин, но само ИФ се асоциираха с хромозомите от метафазната пластинка.

Кумулусните клетки също освен за ИФ бяха положителни и за актин. Разпределението им се припокриваше с тази разлика, че реакцията за ИФ беше по-силна във вътрешността на клетката, а за актин – в периферията. Резултатите от изследването са представени на фиг. 1.

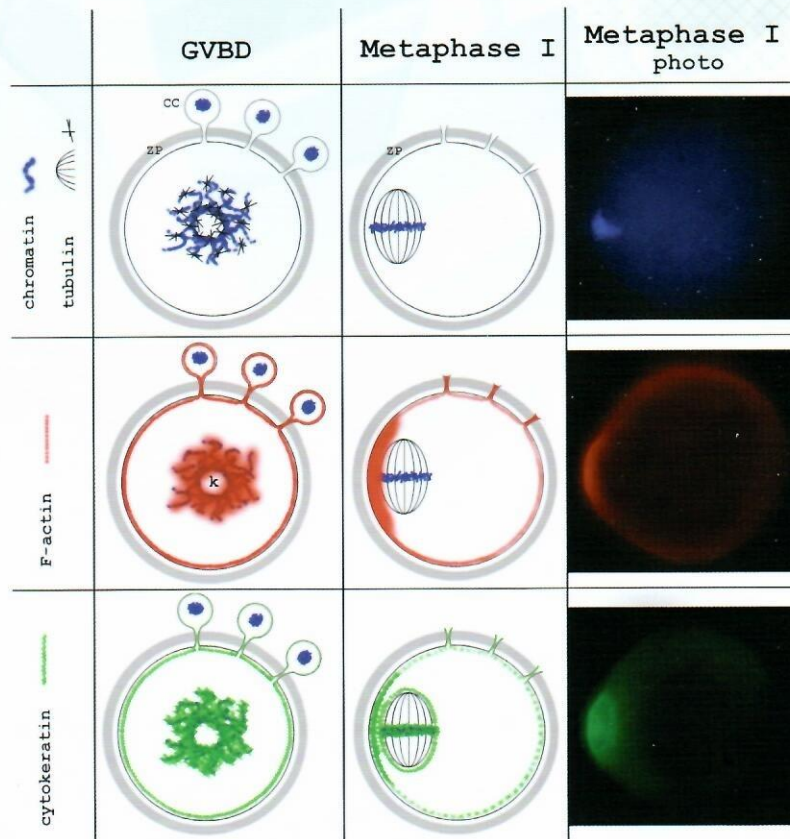
#### *Обсъждане:*

Настоящите резултати доказват наличието на цитоплазмени ИФ в овоцитите от бозайници и

описват тяхното пренареждане от момента на разпадане на ядрената обвивка до закотвянето на мейотичното вретено под овоцитната мембрана. При имуноцитохимичното изследване на миши овоцити и овоцит-кумулусни комплекси за виментин и набор от цитокератини бе установена пълна колокализация на двата типа белтъци на ИФ. Поначало те рядко се синтезират в една клетка, доколкото кератините са характерни за епителните тъкани, а виментинът – за мезенхимните. При култивиране на епителни клетки обаче често освен цитокератини започва да се експресира и виментин във връзка с повишените нива на механичен стрес, свързани с растежа в култура. Най-вероятно в подобни условия са и овоцитите от стадий GV до края на овогенезата.

На всички изследвани стадии се установяваше положителна реакция за ИФ в кортикалния слой на овоплазмата. Такова съсредоточаване на кератинови филаменти под клетъчната мембрана е описано както в епителни клетки, така и в овоцити от земноводни. Функцията му е да осигури механична устойчивост на клетъчната периферия. В епителните слоеве това се постига чрез свързване със съседни клетки посредством десмосоми. Контакт със съседни клетки, по-точно с най-близките кумулусни клетки, е наблюдава и при мишите яйцеклетки на етап GV. То е важно с оглед на осигуряването на механична устойчивост на периферията им и предаването на молекули и сигнали от тях към овоцита. С напредване на овоцитното зреене кортикалната реакция за ИФ отслабваше, освен в свързаната с мейотичното вретено шапка. Това понижение на реакцията се съгласува със схващането за ролята на ИФ за механичното свързване с кумулусните клетки, доколкото връзките с кумулуса постепенно се прекъсват след разпадането на GV.

Друг компартмент на овоцита, в който се наблюдаваше изразена положителна реакция за цитоплазмени ИФ, беше зоната, обграждаща хроматина – ядрената периферия на етап ранен GV, ядрената периферия и кариосферата на етап GV с оформена кариосфера и мейотичното вретено, включително самата метафазна пластинка, на етапи метафаза I и II. Известно е, че в соматичните клетки цитоплазмените ИФ също са склонни да образуват перинуклеарна мрежа и да се асоциират както с делителното вретено, така и със самите митотични хромозоми. В изследваните от нас миши овоцити с напредването на мейозата успоредно с отслабването на реакцията за ИФ в кортекса се засилваше тази, свързана с мейотичното вретено и хромозомите. Това доказва спрегнатото действие на микротубулите, хромозомите и цитоплазмените ИФ при



Фиг. 1. Сравнение на локализацията на микротубулите (тубулин), микрофиламентите (фибриларен актин) и цитоплазмените ИФ (цитокератин) спрямо реорганизацията на хроматин по време на прехода от профазата към метафаза на първото мейотично делене в миши овоцити. ZP – зона пелуцида; CC – кумулусни клетки; k – кариосфера.

реорганизацията на мейотичния хроматин след разпадането на GV.

Следва да се отбележи, че на етап GV след оформяне на кариосферата се появяваше реакция за цитокератини и виментин, свързана с кариосферния хетерохроматин, т.е. във вътрешността на ядрото. Това показва, че с напредването на стадия GV и подготовката на прехода към GVBD, макар видимата структура на ядрото да е все още запазена, се наблюдава навлизане на цитоплазмени белтъци в неговата вътрешност.

За разлика от някои публикувани изследвания, получените от нас резултати не показваха усложняване и разрастване на мрежата от ИФ в овоплазмата по време на овоцитното зреене. Засилване на реакцията се наблюдаваше само в областта на мейотичното вретено и хромозомите, докато тази на кортикалния слой отслабваше. Можем да предположим, че тази редукция е необходима за придаване на по-голяма динамичност на овоцитния цитоскелет. С други думи, ИФ също като микротубулите и микрофиламентите в късните етапи на

овогенезата търпят преобразувания, които най-вероятно са предпоставка за отделянето на полярните телца и дробенето на зиготата.

Установеното при настоящото изследване вътреклетъчно разпределение на ИФ, съответстващо на области с концентрация на микрофиламенти, наложи провеждане на изследвания за колокализация на двата вида цитоскелетни компоненти. Макар че по литературни данни цитоплазмените ИФ могат да сесвързватс микрофиламентите, в повечето тъкани припокриването между ИФ и фибриларния актин е ограничено поради склонността на ИФ да се съсредоточават в централната част на клетката, а микрофиламентите – в периферната.

Двойното белязване на двете цитоскелетни системи в кумулусните клетки даде резултат, подобен на описания за други клетъчни типове, със съсредоточаване на ИФ във вътрешността на клетката и на актина – в периферията ѝ. В самите овоцити обаче се наблюдаваше почти пълна колокализация на микрофиламентите и цитоплазмените ИФ. Това навежда на предположението, че в овогенезата на

бозайниците се наблюдава тясно взаимодействие между двете цитоскелетни системи, макар че без допълнителни данни може само да се предполага дали мрежата от микрофиламенти осигурява основа, на която се изгражда мрежата от ИФ, или напротив, цитоплазмените ИФ стабилизират фибриларния актин. Следва да се отбележи, че резултатите ни за наличието и вътреклетъчното разпределение на фибриларния актин на различните етапи от овоцитното зреене са в съгласие с литературните данни.

Единственият участък със съществена разлика между разпределението на цитоплазмените ИФ и това на микрофиламентите беше ядрената периферия на стадий GV-GVBD и съответно метафазната пластинка на стадии метафаза I и II. На стадий GVBD цитокератините и виментинът показваха много по-силна склонност от актина да се съсредоточават в областта на ядрената периферия и кариосферата, а в по-късните стадии се асоциираха с мейотичните хромозоми, което за актина не се наблюдаваше. Можем да предположим, че белтъците не само на ядрените ИФ (ламините), а и на цитоплазмените ИФ (цитокератини, виментин) са способни да се асоциират с хроматина и да играят роля в неговата реорганизация, докато микрофиламентите не притежават такава функция.

В заключение, имуноцитохимичното изследване показва, че конвенционални цитокератини и виментин се съдържат в мишите овоцити в клетъчния кортекс и около ядрото и хромозомите и търпят реорганизация в хода на овогенезата. Те отслабват връзката си с клетъчната периферия и се концентрират около метафазната пластинка. Това предполага възможна роля на цитоплазмените ИФ при реорганизацията на мейотичния хроматин след разпадането на герминалния везикул.

Цитоплазмените ИФ показват значителна колокализация с фибриларния актин, което сочи тясно взаимодействие между двете цитоскелетни системи. Асоциация с хроматина обаче се наблюдава само за ИФ, което предполага, че те, а не микрофиламентите, са от значение за мейотичните преобразувания на хроматина.

**Адрес за кореспонденция:**

**Доц. Стефка Делимитрева**  
 Медицински университет – София  
 Катедра Биология  
 София 1431, ул. „Здраве“ №2  
 delimitreva@yahoo.com

#### Литература

1. Manandhar G, Schatten H, Sutovsky P. Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biol Reprod* 2005; 72 (1): 2-13
2. Schuh M, Ellenberg J. Self-organisation of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell* 2007; 130 (3): 484-498
3. Делимитрева С. Мейотично зреене на овоцитите – взаимодействие на хроматина и цитоскелетните елементи. *Акушерство и гинекология (София)* 2010; 5: 51-57
4. Almonacid M, Terret ME, Verlhac MH. Actin-based spindle positioning: new insights from female gametes. *J Cell Sci* 2014; 127: 1-7
5. Markova MD, Nikolova VP, Chakarova IV, Zhivkova RS, Diimitrov RK, Delimitreva SM. Intermediate filament distribution patterns in maturing mouse oocytes and cumulus cells. *Biocell* 2015; 39 (1): 1-7.
6. Azoury J, Lee KW, Georget V, Rassinier P, Leader B, Verlhac MH. Spindle positioning in mouse oocytes relies on a dynamic meshwork of actin filaments. *Curr Biol* 2008; 18 (19): 1514-1519
7. Azoury J, Verlhac MH, Dumont J. Actin filaments: key players in the control of asymmetric divisions in mouse oocytes. *Biol Cell* 2009; 101 (2): 69 - 76
8. Zhu ZY, Chen DY, Li JS, Lian L, Lei L, Han ZM, Sun QY. Rotation of meiotic spindle is controlled by microfilaments in mouse oocytes. *Biol Reprod* 2003; 68 (3): 943-946
9. Erber A, Riemer D, Bovenschulte M, Weber K. Molecular phylogeny of metazoan intermediate filament proteins. *J Mol Evol* 1998; 47 (6): 751-762
10. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Chapter 16: The cytoskeleton. In: *Molecular biology of the cell*. 5th edition. *New York: Garland Science* 2008.
11. Mendez MG, Restle D, Janmey PA. Vimentin enhances cell elastic behavior and protects against compressive stress. *Biophys J* 2014; 107 (2): 314-323
12. Suzuki O, Asano T, Yamamoto Y, Takano K, Koura M. Development in vitro of preimplantation embryos from 55 mouse strains. *Reprod Fert Dev* 1996; 8 (6): 975-980
13. Fuchs E, Yang Y. Crossroads on cytoskeletal highways. *Cell* 1999; 98 (5): 547-550
14. Chang L, Goldman RD. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5 (8): 601-613
15. Delimitreva S, Zhivkova R, Isachenko E, Umland N, Nayudu PL. Meiotic abnormalities in in vitro-matured marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) oocytes: development of a non-human primate model to investigate causal factors. *Hum Reprod* 2006; 21: 240-247

# Meriofert®

Високопречистен Менотропин

Човешки фоликулостимулиращ хормон (ФСХ) и човешки лутеинизиращ хормон (ЛХ).  
Човешкият хорионгонадотропин (ЧХГ), естествено съществуващ хормон  
в урината на бременни жени, се добавя с цел да се допринесе към  
цялостната активност на ЛХ.

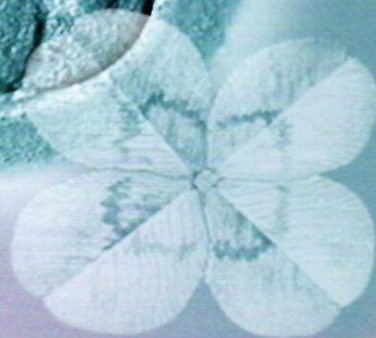
# Fostimon®

Високопречистен Урофолитропин (Urofollitropin)  
(фоликулостимулиращ хормон – ФСХ)

# Choriomon®

Хорионгонадотропин  
(Gonadotrophin, chorionic)

*Когато природата среща иновациите*





# МЕТОДИ ЗА ИН-ВИТРО КУЛТИВИРАНЕ НА ОВАРИАЛНА ТЪКАН ИЛИ ИЗОЛИРАНИ ФОЛИКУЛИ

М. Христова, Е. Христова, П. Тодоров  
Институт по биология и имунология на размножаването – БАН

## METHODS FOR IN-VITRO CULTURE OF OVARIAN TISSUE OR ISOLATED FOLLICLES

M. Hristova, E. Hristova, P. Todorov  
Institute of Biology and Immunology of Reproduction - BAS

**Резюме:** Криоконсервацията на овариална тъкан се използва в клиничната практика за т. нар. „фертилно застраховане“ при онкоболни пациенти с предстояща химио/лъчетерапия, жени с изчерпан яйчников резерв или млади момичета със заболявания, водещи до увреждане на яйчниковата функция. За възстановяване на репродуктивния им потенциал, най-често се прилага автоложна трансплантация на размразената тъкан. При раковоболни пациентки, обаче, този подход крие риск от повторно въвеждане на злокачествени клетки в организма. Поради тази причина, се търси подобряване на съществуващите технологии за култивиране на човешка овариална тъкан с последващо развитие на фоликулите и получаване на яйцеклетки в лабораторни условия. При някои животински видове е постигнат относителен успех чрез използване на различни 2D- и 3D-системи за култивиране, докато при хора все още не са докладвани удовлетворителни резултати. Разработването на подходяща технология представлява предизвикателство в областта на репродуктивните биотехнологии. Изискват се допълнителни изследвания, които да бъдат насочени към изясняване на условията необходими за осъществяване ин-витро на фоликулогенезата и съзряването на овоцитите.

**Abstract:** In clinical practice the cryopreservation of ovarian tissue is used as fertility preservation method in patients with oncological diseases, who need to be subjected to chemo- or radiotherapy, women with diminishing ovarian reserve or young girls with conditions, leading to damage of the ovarian tissue. Autologous transplantation of freeze-thawed samples is used as approach to restore their reproductive potential. However, in oncological patients, this technique carries the risk of secondary transfer of malignant cells in the organism. Due to that reason, there is an ongoing research for optimization of the existing methods for ovarian tissue culture with subsequent follicle development, with the aim to obtain oocytes in laboratory conditions. Relative success has been reported in some studies in animal models with the use of 2D and 3D-culture systems, but in humans satisfying results have not yet been published. The development of competent technique for ovarian tissue culture is still a challenge in the field of reproductive biotechnologies. Additional investigations, aimed to analyse the conditions for in-vitro folliculogenesis and oocyte maturation are necessary.

### Въведение:

В областта на асистираните репродуктивни технологии все повече нараства интересът към ин-витро култивирането на овариална тъкан или отделни фоликули, с цел получаване на зрели овоцити, годни за оплождане. Разработването на такава методика ще даде възможност за запазване на фертилитета на пациентки с изчерпан яйчников резерв, онкоболни жени, преминали през курс на химио/лъчетерапия и др. Известно е, че повечето онкотерапевтични агенти са цитотоксични. Те оказват негативно въздействие върху дейността на яйчниците (гаметогенезата), което води до намаляване на репродуктивния им потенциал. Към момента основният терапевтичен подход при тези пациентки е криоконсервация на фрагменти яйчникова тъкан с цел последваща трансплантация и възстановяване на овариалната функция. Според литературни данни, в световен мащаб има над 100 живородени деца след

автотрансплантация на размразена овариална тъкан [1]. Недостатък на този метод е, че не са добре проучени рисковете свързани с повторно въвеждане на злокачествени клетки в организма при наличие на метастази в транспланта. Това налага внедряването на алтернативна възможност в медицинската практика, която да позволи ин-витро култивирането (IVC) на примордиални фоликули, тяхното развитие и получаването на голям брой зрели овоцити в лабораторни условия.

### Исторически преглед:

Методите за дългосрочно култивиране на фоликули са били разработени първоначално при миши модели. През 1992 година Nayudu and Osborn [2] установяват, че изолирани и инкубирани поотделно миши преантрални фоликули достигат до предовулаторна фаза, като някои от тях претърпяват овулация. Eppig and O'Brien (1996) [3] докладват, че при култивирне на овариална

тъкан от мишка за период от 8 дни, се получават преантрални фоликули, чийто овоцити могат да продължат нормалното си развитие в *in-vitro* среда. По-късно тези технологии започват широко да се използват и при други видове - плъхове, говеда, прасета и хора. Особен интерес към методиката възниква след първата успешно замразена човешка яйчникова тъкан през 1996 година [4]. В литературата има данни за IVC на фоликули с последващо изолиране на ооцити, IVF (in vitro fertilization) оплождане и получаване на ембриони при гризачи, прасета, биволи, овце и кози. Въпреки това живородено потомство е докладвано единствено при мишки [5]. През 1997 *Hovatta et al* [6] успяват успешно да получат вторични фоликули при дългосрочно култивиране на човешка яйчникова тъкан. По-скорошни проучвания показват, че при използване на 2-етапна система за IVC се постига формиране на антрални фоликули и образуване на ооцити в МII фаза [7].

Една от възможните причини за незадоволителните резултати при получаването на яйцеклетки с добро качество е едновременното, неконтролируемо нарастване на пула от фоликули *in-vitro*, което вероятно води до некордириран растеж на ооцита и гранулозните клетки [8]. Това налага по-подробно изучаване на механизмите и факторите регулиращи фоликулогенезата с цел създаване на подходяща система за IVC на човешка овариална тъкан и получаване на компетентни за оплождане яйцеклетки.

#### **Устройство на фоликула:**

Всеки фоликул се състои от овоцит, заобиколен от соматични (гранулозни и тека) клетки и представлява морфофункционалната единица на яйчника. Фоликулогенезата е сложен процес, в който различни ендокринни, паракринни и аутокринни фактори действат координирано, подпомагайки пролиферацията, растежа и диференциацията на гранулозните и тека клетките, и растежа (съзряването) на яйцеклетката. Фоликулите могат да бъдат класифицирани според техния етап на развитие. Пре-антрални фоликули (примордиални, първични и вторични) съдържат незряла яйцеклетка заобиколена съответно от 1 или 2 слоя кубични гранулозни клетки. Те представляват 90% от фоликуларната популация и формират пула от женските гамети или т. нар яйчников резерв. Антралните фоликули (третични и преовулаторни) се характеризират с голяма празнина, запълнена с течност (антрум) и дебел слой плоски или кубични гранулозни клетки. Има данни, че измененията в морфологията на клетките изграждащи фоликулите води до

неправилно протичане на някои процеси, като генната експресия, апоптозата, пролиферацията, диференциацията и стероидогенезата [9].

#### **Условия за *in-vitro* култивиране на фоликули:**

За култивиране на овариални клетки и фрагменти най-често се използват специално разработени за целта среди: *Leibovitz*, *HAM F-10*, *DMEM* или комбинация от тези среди, обогатени с 5 до 20% фетален серум или серумен албумин. Добавянето към тях на различни растежни фактори и хормони допринасят в известна степен за матурацията и растежа на фоликулите. Има данни, че аскорбиновата киселина подпомага фоликулогенезата чрез инхибиране на апоптозата в преантрални фоликули при гризачи [10] и повишава жизнеспособността на фоликули от коза при дългосрочно култивиране [11]. Също така прибавянето на пируват, глутамин, хипоксантин и селен към средата води до стимулиране на растежа и увеличаване на процента на морфологично нормалните фоликули [12]. Съществува информация, че инсулинът действа като важен медиатор на фоликуларното развитие, стероидогенезата и съзряването на ооцитите [13]. Известно е, че прибавянето на гонадотропни хормони към хранителната среда е необходимо за по-ефективен растеж на фоликулите и съзряването на яйцеклетките *in-vitro*. При бозайниците лутеинизиращия (ЛХ) и фоликулостимулиращия (ФСХ) хормони действат координирано и са свързани с развитието на гонадите, регулирането на пролиферацията и диференциацията на фоликуларните клетки и зреенето на ооцита. ЛХ води до активиране на ароматазата в тека клетките, което е свързано с протичане на стероидогенезата, стимулира овулацията и инициира образуването на жълто тяло от гранулозните и тека клетките след настъпване на овулация. ФСХ е отговорен за пролиферацията и диференциацията на гранулозните клетки, поради което има ключова роля при формирането на Граафовия фоликул. Множество проучвания са изследвали ролята на ФСХ в различни системи за култивиране на овариална тъкан. Установено е, че при алгинат-базирана 3D-система, ФСХ се оказва от съществено значение за растежа на фоликули при плъх [14] и човек [15].

Освен гонадотропните хормони, различни растежни фактори секретирани се от гранулозните клетки, оказват пара- и аутокрино действие. Левкемия инхибиращ фактор (LIF), Kit лиганда (KL) и костен морфогенетичен протеин 4 и 7 (BMP-4 и BMP-7) стимулират прехода от примордиален към вторичен фоликул [16], докато GDF-9 (Growth and differentiation factor-9) и BMP-15, секретирани се от ооцита, предизвикват пролиферацията на гранулозните клетки

и подреждането на тека клетките, което е необходимо за преминаването на фоликулите от първичен във вторичен стадий. При много видове гризачи и домашни животни, факторите синтезиращи се от вторичните фоликули – васкуларен ентотелен растежен фактор (VEGF), трансформиращ растежен фактор (TGF), инсулин-подобен растежен фактор (IGF), фибробластен растежен фактор-2 и -7 (FGF-2 and FGF-7), активин и BMPs са необходими за правилното протичане на фоликулогезезата. При отсъствие на тези вещества в средата за култивиране се наблюдава засилен процес на клетъчна апоптоза.

#### Методи за култивиране на фоликули:

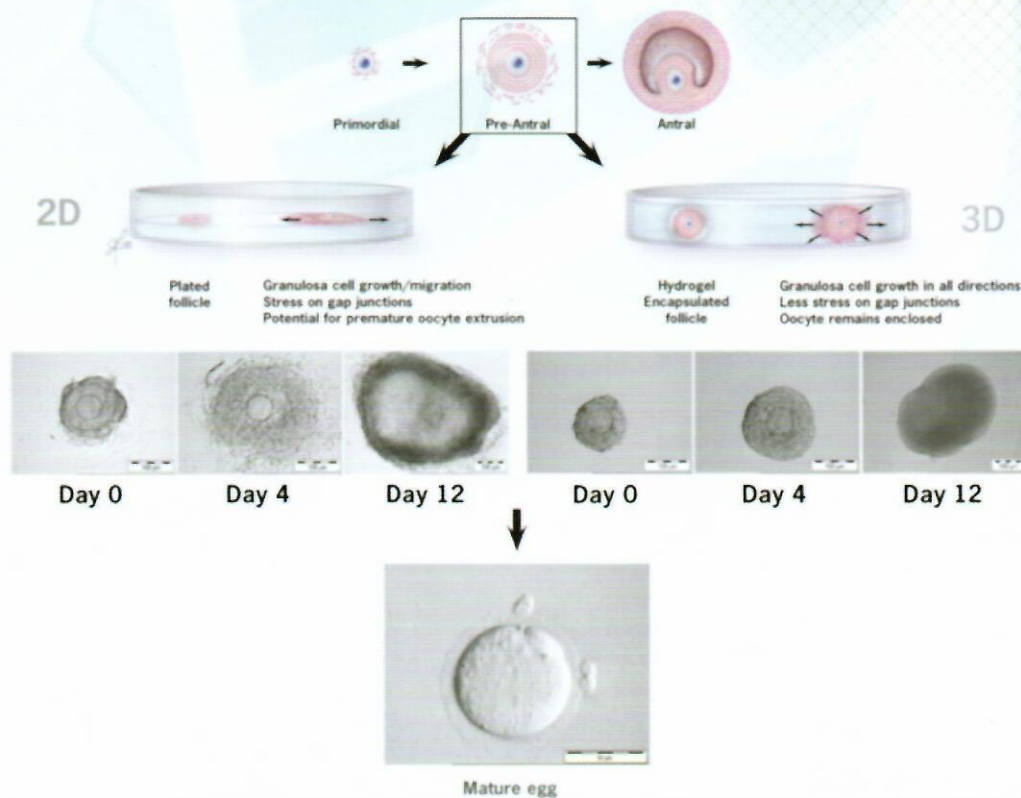
Като подход за възстановяване на физиологичната функция на овариалната тъкан след криоконсервация се използва автотрансплантация или ксенотрансплантация на имунодефицитни мишки. По този начин се цели да се възобнови развитието на примордиалните фоликули намиращи се в кортикалния яйчников слой.

Чрез използване на ксенотрансплантация са постигнати добри резултати при различни животински видове - куче, крава, прасе, котка, включително и хора. Установено е, че при присаждане на човешка яйчникова тъкан на имунодефицитни (SCID) мишки, повече от 50% от примордиалните фоликули продължават по натагъшното си развитие до антрален стадий<sup>[17]</sup>. Възможните варианти след достигане на този етап са яйцеклетките да бъдат изолирани и тяхното съзряване да настъпи в лабораторни условия (*ин-витро* матурация) или да достигнат следващите стадии *ин-виво* при прилагане на подходяща хормонална терапия. Според някои автори, получени човешки яйцеклетки, след ксенотрансплантация, показват абнормална ядрена и цитоплазмена матурация след провеждане на имуноцитохимичен анализ<sup>[18]</sup>. Причини за подобен тип увреждания могат да са различни фактори: процеса на замразяване/размразяване, липса на оптимални протоколи за овариална стимулация, неподходящи условия за развитие на човешки фоликули в животинските реципиенти или на неадекватни техники за *ин-витро* матурация<sup>[19]</sup>. В наличната литература съществуват редица данни за положителни резултати след автоложна трансплантация на размразена овариална тъкан при хора. Чрез ултразвуково изследване на реципиентките е установено нарастване на фоликулите в следствие на стимулация с гонадотропни хормони. Настъпване на овулация е детектирано след приложение на човешки хорион гонадотропин. През 2004 година за първи път е докладвано за

живородено дете след автоложна трансплантация на размразена яйчникова тъкан. Последните години се съобщава за все повече родени деца чрез използване на тази методика. Независимо, че този подход се прилага и при онкоболни пациентки, все още не са добре проучени рисковете свързани с повторно въвеждане на злокачествени клетки в организма. Евентуално решение на този проблем се търси в разработването на подходяща методика за култивиране *ин-витро* на размразена овариална тъкан, при която развитието на фоликулите и зреенето на овоцитите ще се извършва в лабораторни условия. Ембриони получени след IVF на такива яйцеклетки не биха представлявали риск за реципиента след извършване на ембриотрансфер.

Най-разпространените подходи при култивиране на клетки и тъкани *ин-витро* са 2D- и 3D-системите. При 2D-системата фрагментът тъкан се поставя на дъното на петриевы панички, матрачета или плаки. При култивиране на органи експлантати в подобни условия протича прикрепяне на фрагмента тъкан към повърхността, а след това се наблюдава прорастване (миграция) на различни видове клетки около него. Следва да се отбележи, че тъканните фрагменти са комплексна система, в която присъстват както витални фоликули в различен стадий на зрелост, така и атретични фоликули и екстрафоликуларни клетки. Според наши изследвания за *ин-витро* култивиране на овариална тъкан бе отчетена миграция на фибробластоподобни клетки около фрагмента на 2-3 ден, а впоследствие (след 5 ден) върху тях прорастаха епителоподобни клетки. Към 7-10 ден наблюдавахме придвижване на по-малки, но също с епителиоподобна форма клетки. Към края на втората седмица установихме елементи на самоорганизация-открити лумени и тубулоподобни структури. Има данни, че *ин-витро* гранулозните клетки образуват подобни структури. Този процес на придвижване на гранулозните клетки от фоликулите към субстрана предизвиква ремоделиране на структурата и промяна в морфологията им. Според някои автори продължителното култивиране в 2-D система води и до увреждане на базалната мембрана, нарушения в междуклетъчните контакти и взаимодействието на клетките с екстрацелуларния матрикс<sup>[20]</sup>.

За разлика от гореописания подход, 3D-системата осигурява запазване на структурната цялост на фоликулите, тъй като поради отсъствие на адхезивна повърхност клетките не могат да мигрират<sup>[15]</sup> (Фиг.1). Разработени са различни 3D-технологии, при които фоликулите „плуват“ в суспензия при непрекъснато разклащане („floating“ система), инкубират се в т.нар



Фиг. 1. *Ин-витро* култивиране на фоликули в 2D- и 3D-система.

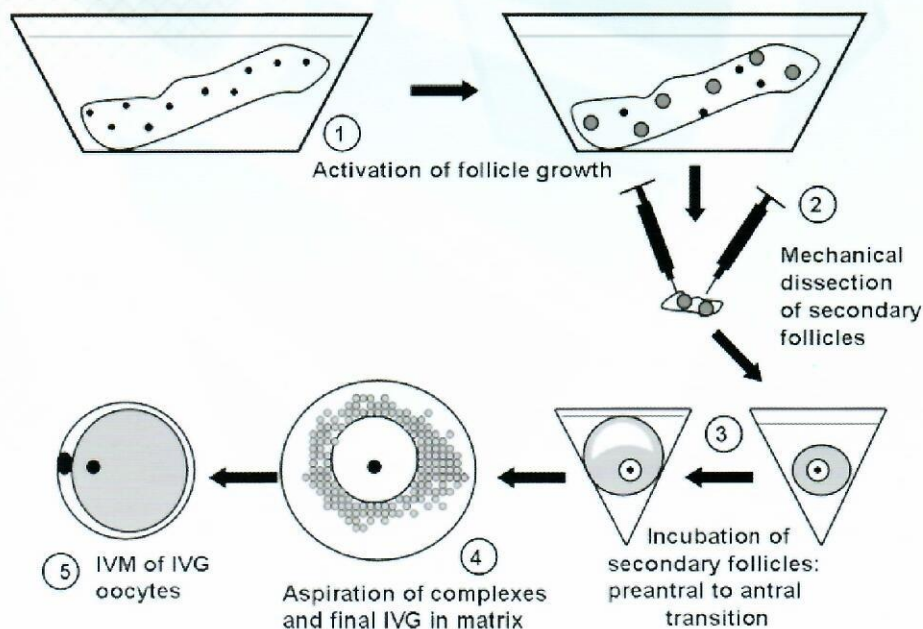
„висяща“ капка или се култивират в различни полутечни хранителни среди (синтетични или биологични хидрогелове). По този начин се създават условия спомагащи за съхранението на сферичната им форма. Това играе определяща роля за организирането и комуникацията между клетките, клетъчната диференциация и отговора към биохимичните сигнали от средата [21].

Към 3D-методиките спадат т. нар „floating“ системи. За тях е характерно инкубирането на фоликулите в суспензия при непрекъснато леко въртене на епруветката в която са култивирани. Този метод се използва с цел предотвратяване на адхезията на клетките към повърхността на лабораторния съд. Като недостатък може да се посочи, че постоянната ротация на съда може да доведе до увреждане на фоликулната архитектура.

По-задоволителни резултати се наблюдават при прилагане на технологията „висяща“ капка. Върху капаче на петриева паничка или плака се прави капка от хранителна среда и фоликулът се прехвърля в нея. После съда се обръща надолу, а повърхностното напрежение задържа капката към него. Тази система е разработена, за да се постигне по-добро разпределение на хранителните вещества и кислорода до фоликула и да се подпомогне запазването на структурата му [22]. При експерименти с овариална тъкан

от мишки и овце е наблюдавано, че в такава 3D-система фоликулите се развиват по различен начин, когато се култивират индивидуално или на групи [23]. Според наши проучвания с човешки фоликули не бе отчетена разлика в развитието им, когато ги инкубирахме поединично или по няколко в капка. В част от експериментите наблюдавахме „слепване“ на фоликулите и образуване на агрегати. При по нататъшното им развитие и в двата случая (култивирани поединично или на групи) част от тях увеличаваха размерите си, а други ставаха атретични. Само при 5-10% от фоликулите наблюдавахме началото на образуване на кухини, след което те спираха развитието си. Използвайки подобни 3D-системи за култивиране на фоликули от лабораторни животни, някои автори наблюдават достигането им до преовулаторен стадий и оплождане на получени от тях яйцеклетки [24]. За съжаление подобни резултати все още не са постигнати при хора.

Нов подход в 3D-култивирането на овариалната тъкан и изолирани фоликули е енкапсулирането им в т.нар хидрогелове. Те са естествени или синтетични полимери, способни да абсорбират значително количество вода. Най-често използваните синтетични гелове са полиетилен гликол (PEG), полигликолова киселина и поливинилол алкохол. Тъй като те не съдържат биоактивни вещества се налага добавянето на



Фиг. 2. Двуетапна система за култивиране на фоликули.

различни растежни фактори и хормони към тях. Има данни, че от синтетичните полимери PEG е най-подходящ за култивиране на овариални фоликули [25]. Основното му предимство е, че постепенно се разгражда от протеазите отделящи се от развиващия се фоликул по време на култивиране, с което се осигурява пространство необходимо за нарастването му. Естествените хидрогелове се състоят от протеини и компоненти на екстрацелуларния матрикс (колаген, фибрин, хиалууронова киселина, матригел, включително и полизахариди, като агароза и алгинат). Богатия набор от биомолекули оказва въздействие върху фоликулогенезата, но е трудно да бъде определено точно кои клетъчни процеси се повлияват.

Последните няколко години значителен напредък е постигнат при човешки овоцити именно чрез използване на хидрогелове и чрез двуетапната техника за култивиране [14]. Двустепенната система включва: култивиране на фрагмент яйчникова тъкан, активиране на приморфалните фоликули към развитие до образуване на вторични фоликули, механично изолиране на нарастналите фоликули и инкубирането им по отделно до достигане на преовулаторен стадий и получаване на зрял овоцит (Фиг.2). На практика към момента зрели овоцити са получени единствено при мишки, докато за по-едри бозайници и човек това се оказва изключително трудна задача.

Друго предимство на 3D-системата е, че трофичните фактори отделящи се от гранулозните клетки остават в непосредствена

близост до овоцита и оказват положителен ефект върху оогенезата. Независимо от редицата преимущества на този вид системи за култивиране, съществуват доста противоречия по отношение на вида използвани биоматериали, техните характеристики, пропускливостта и токсичността им. Периода за *in-vitro* матурация на фоликулите при различните видове животни, също е от съществено значение за избора на определена 3D-система. Така например при хора достигането до фаза на антрален фоликул може да отнеме 120 дни, за разлика от гризачите където са нужни около 30 дни. Необходими са допълнителни проучвания и подбор на подходящи вещества с благоприятни химични и физични свойства за развитието на фоликулите, което ще допринесе за разработването и внедряването в практиката на подходяща технология за *in-vitro* култивиране на овариална тъкан.

#### Заклучение:

Независимо от постигнатите до момента успехи с 3D-култивирането на овариална тъкан, все още не са докладвани данни за получени яйцеклетки годни за оплождане при човек. Редица процеси свързани с фоликулогенезата и зреенето на овоцитите остават неизвестни. Изискват се допълнителни и по-задълбочени проучвания относно връзката между структурата и функцията на фоликулите. Това от своя страна ще допринесе за подобряване на биотехнологиите за IVF и за оптимизиране на методите за лечение на безплодието.

### Благодарности:

Подобен род изследвания са обект на научноизследователски проект ДФНП 17-29, финансиран по „Програма за подпомагане на млади учени и докторанти - 2017 г.“ – Българска академия на науките.

### Литература

1. Suzuki N. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation using thawed ovarian cortex for fertility preservation. *The Onco Fertility Journal*, 2018, 1(1):3-8.
2. Nayudu PL and Osborn SM. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. *J Reprod Fertil* 1992, 95(2):349-62.
3. Eppig JJ and O'Brien MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 1996, 54(1):197-207.
4. Hovatta O, Silye R, Krausz T, Abir R, Margara R, Trew G, Lass A, Winston RM. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum Reprod* 1996, 11(6):1268-72.
5. Bertoldo MJ, Walters KA, Ledger WL, Gilchrist RB, Mermillod P, Locatelli Y. In-vitro regulation of primordial follicle activation: challenges for fertility preservation strategies. *Reprod Biomed Online* 2018, 36(5):491-499.
6. Hovatta O, Silye R, Abir R, Krausz T, Winston RM. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum Reprod* 1997, 12(5):1032-6.
7. Xiao S, Jiyang Z, Romero M, Smith KN, Shea LD and Woodruff TK. In vitro follicle growth supports human oocyte meiotic maturation. *Sci Rep* 2015, 5: 17323.
8. Telfer EE and Zelinski MB. Ovarian Follicle Culture: Advances and Challenges for Human and Non-human Primates. *Fertil Steril* 2013, 99(6): 1523-1533.
9. Birgersdotter A, Sandberg R and Ernberg I. Gene expression perturbation in vitro—a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol* 2005, 15(5):405-12.
10. Murray AA, Molinek MD, Baker SJ, Kojima FN, Smith MF, Hillier SG, Spears N. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. *Reproduction* 2001, 121(1):89-96.
11. Rossetto R, Lima-Verde IB, Matos MTH, Saraiva MVA, Martins FS, Faustino LR, Araújo VR, Silva CMG, Name KPO, Bão SN. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. *Domest Anim Endocrinol* 2009, 37:112-123.
12. Araújo VR, Gastal MO, Figueiredo JR, and Gastal EL. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2014, 12: 78.
13. Sato A, Sarentonglaga B, Ogata K, Yamaguchi M1, Hara A, Atchalalt K, Sugane N, Fukumori R, Nagao Y. Effects of insulin-like growth factor-1 on the in vitro maturation of canine oocytes. *J Reprodand Dev* 2018, 64(1):83-88.
14. Kreeger PK, Fernandes NN, Woodruff TK, Shea LD. Regulation of mouse follicle development by follicle-stimulating hormone in a three-dimensional in vitro culture system is dependent on follicle stage and dose. *Biol Reprod* 2005, 73(5):942-50.
15. Xu M, Banc A, Woodruff TK and Shea LD. Secondary follicle growth and oocyte maturation by culture in alginate hydrogel following cryopreservation of the ovary or individual follicles. *Biotechnol Bioeng* 2009, 103(2):378-86.
16. Komatsu K, Koya T, Wang J, Yamashita M, Kikkawa F, Iwase A. Analysis of the Effect of Leukemia Inhibitory Factor on Follicular Growth in Cultured Murine Ovarian Tissue. *Biol Reprod* 2015, 93(1):1-8.
17. Oktay K, Newton H and Gosden RG. Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice. *Fertilnd Steril* 2000, 73(3):599-603.
18. Kim SS, Kang HG, Kim NH, Lee HC, Lee HH. Assessment of the integrity of human oocytes retrieved from cryopreserved ovarian tissue after xenotransplantation. *Hum Reprod* 2005, 20(9):2502-8.
19. Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonck A, Demylle D, Dolmans MM. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(5): 519-535.
20. Cukierman E, Pankov R and Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol* 2002, 14(5):633-9.
21. Zuccotti M, Merico V, Rebuzzini P, Belli M, Vigone G, Mulas F, Fassina L, Wruck W, Adjaye J, Bellazzi R, Garagna S. 3D culture of ovarian follicles: a system towards their engineering? *Int J Dev Biol* 2015, 59(4-6):211-6.
22. Nation A and Selwood L. The production of mature oocytes from adult ovaries following primary follicle culture in a marsupial. *Reproduction* 2009, 138(2):247-55.
23. Spears N, deBruin JP and Gosden RG. The establishment of follicular dominance in co-cultured mouse ovarian follicles. *J Reprod Fertil* 1996, 106: 1-6.
24. Smitz JE and Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* 2002, 123: 185-577.
25. Belli M, Vigone G, Merico V, Redi CA, Zuccotti M, Garagna S. Towards a 3D culture of mouse ovarian follicles. *Int J Dev Biol* 2012, 56(10-12):931-7.

### Адрес за кореспонденция:

Марина Христова, дб

ИБИР-БАН

София 1113, бул. „Цариградско шосе“ №73

mchristova\_@abv.bg

## НОВИНИ ОТ МРЕЖАТА

На 25.07.2018 отбелязахме 40-годишнината от раждането на първото дете в света, заченато по метода ин витро. В България първата успешна процедура е проведена през 1988 г.

За изминалите години, повече от 8 милиона деца в света са родени с помощта на асистиран репродуктивни технологии. На годишна база се провеждат около 2 милиона цикъла и се раждат повече от половин милион бебета.

За Европа общия брой проведени процедури годишно (IVF, ICSI и донорство на яйцеклетки) е 800 000 с 157 449 родени деца. Лидер е Испания, в която през 2015 са проведени 119 875 ин витро цикъла. На второ място е Русия с 110 723, след това Германия с 96 512 и Франция с 93 918. Тази статистика, обаче, не включва Великобритания, която има около 60 000 цикъла годишно. В световен мащаб най-много процедури са проведени в Япония - 424 151 през 2015 г. и са родени 51 001 бебета, което прави 5% от всички родени деца.

Интересно е да се отбележи, че делът на ICSI процедурите е по-голям отколкото на конвенционалното IVF, като съотношението им е около 2:1. По-голям процент имплантирани ембриони е регистриран след трансфер на петия ден, в сравнение с третия. Намалява и броя на многоплодните бременности, както и единичните ембриотрансфери. Поради оптимизиране на технологиите за криоконсервация се увеличава и количеството на трансферите на размразени ембриони (около 15% през 2015), както и използването на криоконсервирани яйцеклетки.

### *Времето на получаване на еякулата влияе върху качеството на сперматозоидите*

Учени от Университета в Цюрих, анализират 12 245 проби сперма от 7 068 мъже в периода 1994-2015 г. При нормозооспермия, най-добри показатели по отношение на морфология и концентрация са получени при получаване на еякулатите между 5 и 7.30 часа сутрин, в сравнение с по-късно през деня. Не са отчетени разлики в подвижността на сперматозоидите.

При мъже с нарушения в спермограмата, концентрацията на гаметите също е била най-висока в посочения по-горе времеви интервал, а най-висока подвижност е отчетена при пробите получени между 8.30 и 10 часа сутрин.

Авторите отбелязват, че циркадните ритми имат влияние върху тези колебания в качеството на получените еякулати.

Също така е установена и сезонна разлика в спермалните показатели. През пролетта се повишава концентрацията и общото количество на гаметите, а през лятото делът на сперматозоидите с нормална морфология. Не са намерени вариации по отношение на подвижността през различните сезони.

### *Рязко намалява фертилността при бошинството мъже в репродуктивна възраст в развитите страни*

Американското андрологично общество анализира резултатите от 185 изследвания, проведени в рамките на 40 години – от 1973 до 2011 г., включващи около 43 000 мъже. Изводите показват, че за този период, в Европа, Северна Америка и Австралия, количеството сперматозоиди в еякулата намалява с 52,4%. При младежи, които все още нямат деца, концентрацията спада от 99 до 47 млн/мл.

Според експертите, тези резултати показват не само понижаване на фертилността, но и на общото здравословно състояние и се дължат на комплексни причини – лошите екологични условия в големите градове, пренебрегването на физическата активност, вредните навици.

### *Създаден е първият в света изкуствен яйчник*

Специалисти по репродуктивна биология в Копенхаген са разработили технология за изграждане на изкуствен яйчник от тъкани на пациента. Замразяването на овариална тъкан се използва като метод за запазване на фертилитета при онкоболни жени. За съжаление, при този подход съществува риск от повторно въвеждане на туморни клетки в организма при автотрансплантацията на размразената тъкан. Новата разработка на датските учени, изключва тази възможност, като изчиства експлантираната яйчникова тъкан на пациентките от потенциални ракови клетки. Оставя се само „скелет“ от съединителна тъкан, на който се поставят изолираните преди това фоликули, които продължават своето развитие. Впоследствие, полученият яйчник се трансплантира обратно. Наблюдава се възстановяване на менструалния цикъл и възможност за забременяване по естествен път. Все още продължават лабораторните изследвания на технологията и са необходими между пет и десет години по прогноза на авторите за въвеждането ѝ в клиничната практика.

### *Установена е микрофлора в тестиса*

До момента се счита, че тестисите са изолирани от останалата част на тялото и са практически стерилни. Учени от Италия докладват за наличието на четири вида бактерии и което е още по-интересно, констатира връзка между количествения и качествения състав на тази микрофлора и фертилността. При здрави мъже се срещат малък брой и от четирите вида микроорганизми, докато при азооспермия количеството им е по-голямо и не присъстват всички видове.

### *Седемнадесет донора на сперма във Великобритания имат още повече от 500 деца*

Информацията бе публикувана от HFEA (Human Fertilisation and Embryology Authority). За периода от 1991 до 2015 година, 17 донора са станали бащи не по-малко от 30 пъти. Повече от 6 000 донора са станали бащи 9 или по-малко пъти. При 104 са установени от 20-29 деца, а при 1557 – от 10 до 19. Съгласно правилата на HFEA, донорите нямат право да дават генетичен материал в повече от 10 семейства (които могат да използват донора нееднократно).

### *Създаден е ембрион от стволови клетки*

Изследователи от университета в Маанстрихт са успели да получат жизнеспособен ембрион от стволови клетки в лабораторни условия, без използването на яйцеклетки и сперматозоиди. Работата им се базира на сливането на два вида миши ембрионални стволови клетки, като в резултат достигат до ембрион на стадий около трети ден. Необходими са още изследвания до получаването на напълно жизнеспособен ембрион. Холандските учени се надяват разработката им да помогне в проучването на причините за нарушенията на имплантацията, лечението на безплодие и изпитване на нови медицински препарати. Много от колегите им, обаче, изказват опасения от етичен характер за изследването, което бе могло да доведе до по-лесно клониране в бъдеще.

### *Разработен е метод за 3D диагностика на ембриони*

Новата технология, която се нарича GLIM (Gradient Light Interference Microscopy) позволява да се получи детайлно обемно изображение на многоклетъчен обект. Изследванията са проведени от учени (професорът по изчислителна техника Габриел Попеску и професор Матю Уийлър от Университета на Илинойс) върху ембриони от едър рогат добитък. GLIM комбинира два вида микроскопия и холограмно изображение, като в резултат се получава триизмерен образ на ембриона в течение на няколко минути. Едно от главните достойнства на технологията е нейната неинвазивност.

### *Американското дружество по репродуктивна медицина (ASRM) основава свой изследователски институт*

Предвиденият бюджет на института за следващите 5 години ще бъде 10 милиона долара, а фокусът на провежданите изследвания ще бъде върху практическата страна на репродуктивната медицина, транслиращи проучвания върху човешки гаметни и ембриони, дългосрочни анализи на здравния статус на родените от ин витро деца и техните семейства. Друга важна цел на създаването на института ще бъде подготовката на специалисти и изследователи в областта.

### *Човешки функционално зрели ооцити са получени за първи път в лабораторни условия*

Изследването е проведено в Университета на Единбург, като са култивирани фоликули от 87 овариални фрагмента в продължение на 16 дни. След това са изолирани кумулус-ооцитните комплекси, които са отново посяти върху мембрана за още 4 дни. Общо 32 от получените комплекси са подложени на ин витро матурация, като при 9 от тях е наблюдавана експанзия на гранулозните клетки и достигане на метафаза II. При всички е отбелязана правилна организация на полярното телце и присъствие на делително вретено. Авторите признават, че качеството на яйцеклетките не е било високо, но проучването им отваря врати към разработването на система за ин витро култивиране на яйцеклетките от ранните стадии на развитие на фоликулите.

### *Наблюдава се влошаване на качеството на семенната течност при деца родени след ICSI*

Тази година в Барселона бе проведен годишният конгрес на ESHRE, в който взеха участие 12 179 делегата от 130 страни. В единия от пленарните доклади бяха представени резултати, касаещи качеството на семенната течност при млади мъже (18-22 години) родени след ICSI. Установено е намаляване на концентрацията и общото число подвижни сперматозоиди в еякулата в сравнение с контролната група. Това дава основание на авторите да изкажат предположението, че мъжкия субфертилитет се предава в наследство.



## Всичко за Вашата лаборатория

### Специализирани реактиви

Продуктовата линия обхваща културални среди, среди за обработка на сперма, среди за криосъхранение и ин витро диагностика, ензими, реактиви за подготовка и др.

Диагностични материали – Episcreen, LeucoScreen, Fructose test, Varicoscreen, Vitalscreen, Hypo-osmotic Swelling test, Spermac stain.

Среди за клетъчно култивиране – Fercult IVF, Flushing, G3, PVP, ICSI kit, Mineral oil.

Среди за подготовка на семенна течност- Sil-Select Plus, Sil-Select Stock. Замразяващи среди – Embryofreeze, Spermfreeze, VitriFreeze, VitriThaw.

### Специализирани консумативи

SparMed е датска компания специализирана в производството на пластмасови специализирани консумативи и филтри за IVF, отчитачи устройства за лаборатории, дезинфектанти, камери и др. консумативи.

Gynetics- компанията посветена на женското здраве, разработва и предлага най-добрите медицински продукти, осигуряващи областта на възпроизводството и контрацепцията- консумативи за вземане на проби, катетри за ембрио трансфер, катетри за вътрематочно оплождане, сет за аспирация на фоликули.

### Лабораторна апаратура

Специализирани ламинарни боксове за IVF- съчетават в себе си иновативна енергоспестяваща система, ламинарна технология и HEPA филтрация. Боксовете са под постоянен микропроцесорен контрол, с визуална и звукова аларма, като осигуряват чисти и стерилни работни условия. В тези апарати може да бъде инсталиран стереомикроскоп. Продуктовата гама се допълва от CO<sub>2</sub> инкубатори, микроманипулатори, микроскопи- изправени, инвертни и стерео, лабораторни хладилници и фризери и всякакъв вид съпътстваща апаратура за IVF лаборатории.



GYNEMED  
Medizinprodukte GmbH & Co. KG



IVFtech

illumina

GYNETICS

Leja

FertiPro

sparMED  
GÖssafe in IVF Laboratories

PHCBI

AIR LIQUIDE

eppendorf

Labotect  
Labor-Technik-Göttingen

HAMILTON THORNE

Nikon

София, България  
кв. Банишора, ул. Врана 82,  
Тел. +359 2 983 96 49  
Факс: +359 2 983 22 11  
email: office@elta90.eu  
www.elta90.com

Bucharest, Romania  
Str. Nicolae G. Caramfil, Nr.22A Sector 1  
Tel: +40 21 232 26 94  
Fax: +040 21 232 26 96  
email: office@elta90mr.ro  
www.elta90mr.ro

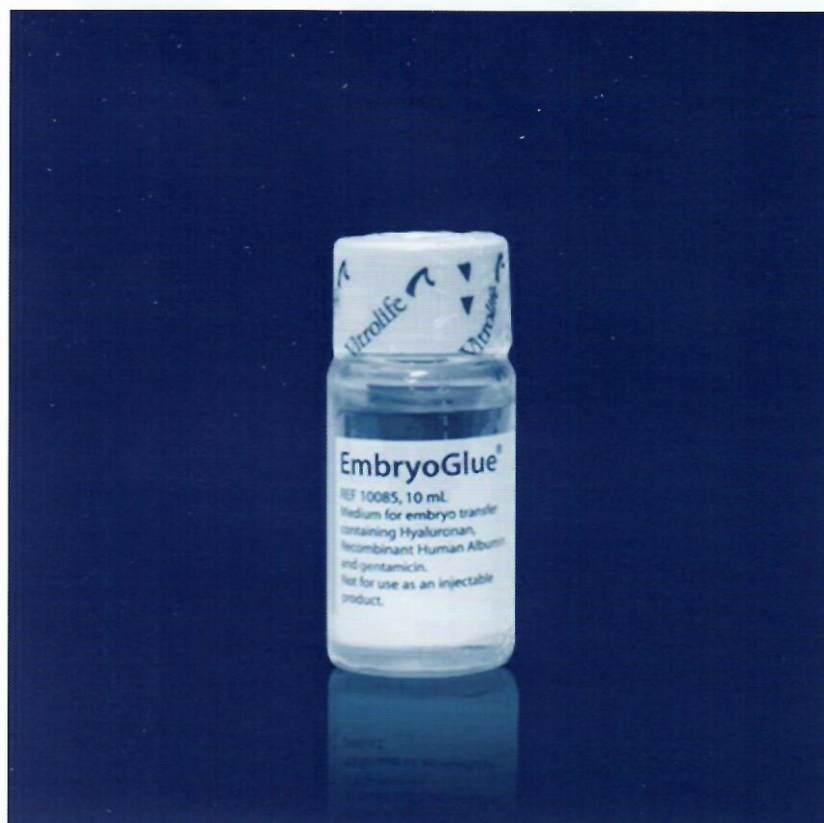
Belgrade, Serbia  
Svetog Klimenta 26  
Tel: +381 11 2852650  
Fax: +381 11 28 52 850  
email: office@elta90ms.com  
www.elta90ms.com

Skopje, Macedonia  
Mobile: +389 78 304 645  
Tel: + 389 02 5117 017  
Fax: + 389 02 5117 017  
toni.stefanovski@elta90mm.mk  
www.elta90mm.mk

## ПРЕДСТОЯЩИ КОНГРЕСНИ ПРОЯВИ ПРЕЗ 2019 ГОДИНА

<b>5-7 January</b> Sanya China	The 2 <sup>nd</sup> International Conference on Gynaecology, Obstetrics and Reproductive Medicine
<b>21-23 February</b> Alicante Spain	ESHRE Campus: Gynaecological pathologies at adolescence
<b>13-16 March</b> Paris France	SRI (Society for Reproductive Investigation) 66 <sup>th</sup> Annual Meeting
<b>14-16 March</b> New York City USA	Best of ESHRE and ASRM
<b>04-06 April</b> Salzburg Austria	ESHRE Campus: Trying to mimic Mother Nature: the impact of physical and chemical factors on human embryo culture
<b>04-06 April</b> Palma de Mallorca, Spain	The 8th International IVIRMA Congres
<b>11-14 April</b> Shanghai China	International Federation of Fertility Societies World Congress
<b>01-02 May</b> Lisbon Portugal	ESHRE Campus: Gene editing tools for reproductive medicine: are we close?
<b>09-10 May</b> Edinburgh UK	ESHRE Campus: Fertility preservation in children and adolescents: the next frontier
<b>16-18 May</b> Ghent Belgium	ESHRE Campus: Top quality in micromanipulation: everything you always wanted to know about ICSI and embryo biopsy
<b>23-26 June</b> Vienna Austria	ESHRE Annual Meeting
<b>26-29 June</b> Los Angeles California, USA	International Society for Stem Cell Research Annual Meeting
<b>12-16 October</b> Philadelphia, PA USA	75 <sup>th</sup> ASRM Scientific Congress and Expo
<b>21-23 November</b> Paris France	The 27 <sup>th</sup> World Congress on Controversies in Obstetrics Gynaecology and Infertility

## EmbryoGlue® increases take home baby rate



A prospective, randomised study presented at ESHRE 2011 showed a significant increase in take home baby rate when using EmbryoGlue® for transfer, compared to the control group.

„We have now shown that EmbryoGlue® results in more babies being born compared with traditional products, irrespective of the day for transfer”, says Dr. Basak Balaban, one of the authors of the study.

The take home baby rate for embryo transfer on day 5 was 63.4% using EmbryoGlue compared to 52.2% in the control group.

The independent Cochrane report has previously shown that EmbryoGlue® has a positive effect on pregnancy frequency. EmbryoGlue® is a medium developed exclusively for embryo transfer and the only existing product with proven implantation enhancing effect.

[Read more about EmbryoGlue®](#) and how its unique combination of hyaluronan and human recombinant albumin improves implantation and pregnancy rates.

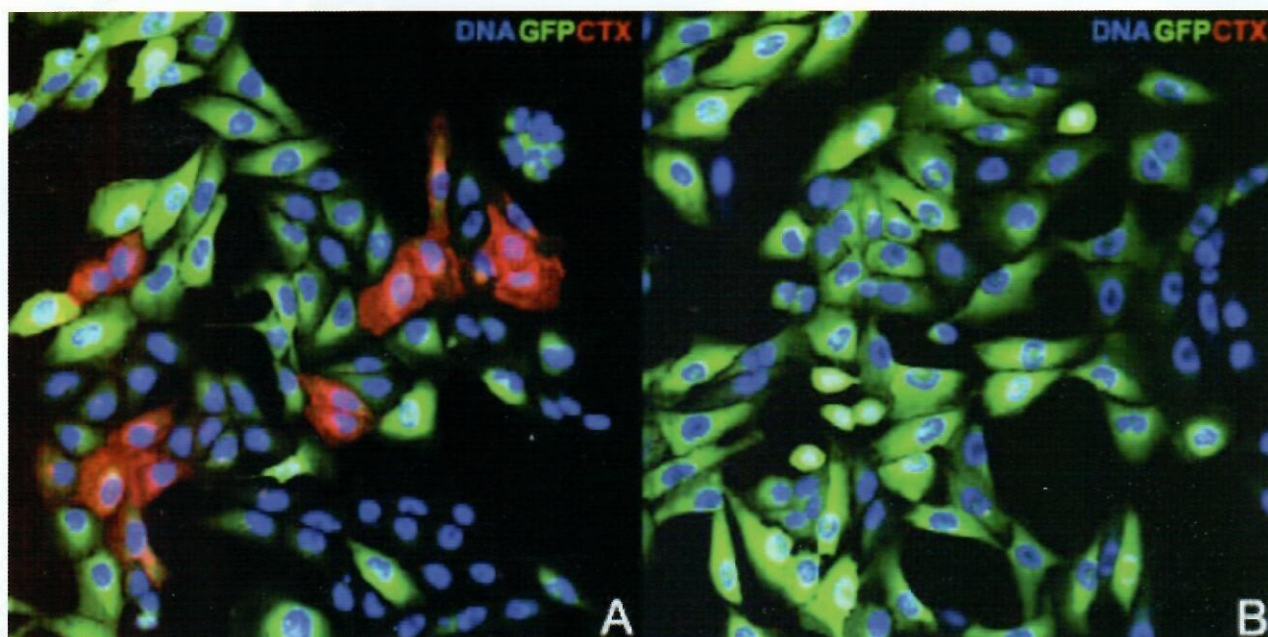
Поръчайте EmbryoGlue® сега на специална цена от изключителния дистрибутор на VITROLIFE за България:

[Витро Медиа Груп \(част от Аквахим АД\)](#), София 1582, бул. „Цветан Лазаров”83, тел. 00359887 55 3373, [lubomir.pramatarov@aquachim.bg](mailto:lubomir.pramatarov@aquachim.bg)



***InCell Analyzer:*** Системи за високо информативен анализ на събития и образи на субклетъчно ниво в реално време, от General Electric Life Sciences.

**Приложения:** Nuclear translocation, Receptor internalization, Mitochondrial translocation, Protein expression, Apoptosis, Ligand binding, Reporter gene expression, Cell cycle analysis, Neurite extension, Cell morphology



Повече информация на: <http://www.gelifesciences.com/incell>

За контакти:



**ЛКБ България ЕООД**

Ул. "Проф. М. Бичев" №1  
1504 София

Тел: +359 2 943 4374

E-mail: [lkb.bg@lkb.eu](mailto:lkb.bg@lkb.eu)



## НАУЧНА ИНФРАСТРУКТУРА „КЛЕТЪЧНИ ТЕХНОЛОГИИ В БИМЕДИЦИНАТА“ - ПРИОРИТЕТЕН ПРОЕКТ В НАЦИОНАЛНА ПЪТНА КАРТА ЗА НАУЧНА ИНФРАСТРУКТУРА (2017-2023 Г.)

В периода 2013-2017 е картографирана и впоследствие включена като обект от Националната пътна карта за Научна инфраструктура 2017-2023 нова Научна Инфраструктура „Клетъчни Технологии в Биомедицината“ (НИКТБ) с участието на Българска Асоциация по Репродуктивна Човешка Ембриология. НИКТБ е обърната към решаването на демографски проблеми, свързани с качеството на репродуктивното здраве и преждевременното застаряване на нацията. По статистически данни България е петата най-застаряваща нация в ЕС, като според прогнози на СЗО се очаква населението на страната да намалее с 1.5 милиона души и през 2050 год. да наброява едва 5.5 мил. Едни от съществените медико-биологични причини за тези прогнози са значително повишения брой българи с репродуктивни проблеми и ниската раждаемост, при силно скъсена продължителност на живота спрямо другите държави в ЕС.

**Новата инфраструктура** е консорциум, основаващ се на публично-частно партньорство, в което си взаимодействат Софийски Университет и Институти на БАН, неправителствени организации и частни клиници в областта на новите клетъчни биотехнологии и репродуктивната медицина. Основната мисия на консорциума е ПРЕОДОЛЯВАНЕ НА ДЕМОГРАФСКИ ПРОБЛЕМИ ЧРЕЗ ПОВИШАВАНЕ НА КАПАЦИТЕТА И КАЧЕСТВОТО НА ВЪЗПРОИЗВОДСТВО НА НАЦИЯТА, ПОДОБРЯВАНЕ НА ОБЩОТО И РЕПРОДУКТИВНОТО ЗДРАВЕ И ПРЕВЕНЦИЯ НА ЗАСТАРЯВАНЕТО ЧРЕЗ ИНДИВИДУАЛИЗИРАНИ КЛЕТЪЧНО-БИОЛОГИЧНИ И МЕДИЦИНСКИ ПОДХОДИ.

Научната инфраструктура отговаря на потребностите на медико-биологичната общност за:

- (1) Създаване на стандартизирани клетъчни продукти на базата на стволови клетки за преодоляване на тежки репродуктивни смущения и възстановяване на репродуктивни функции;
- (2) Разработване на нови методи за оценка и подобряване качеството на репродуктивните клетки и ембрионите чрез;
- (3) Развитие на иновативни технологии за клетъчна терапия и персонализирана медицина, включително за работа с ембрионални и възрастни стволови клетки и обучение на специалисти в тази област;
- (4) Усъвършенстване на съществуващите и разработване на нови методи за тестване на лекарствени средства и биологично активни вещества на базата на клетъчни и ембриологични моделни системи.

Инфраструктурата ще бъде обслужвана от 5 технологични платформи, съставени от допълващи се звена в отделните партньори, като целта е да бъдат максимално използвани досегашния опит и съществуващи ресурси от специалисти и технологии. Платформите ще разработят план за свободен достъп за научни и учебни цели, както и предоставяне на специализирани услуги за бизнеса в полза на икономиката с цел повишаването на здравето на обществото.

Очакваните ползи от функционирането на инфраструктурата включват създаване на иновации, трансфер на знание, подготовка на висококвалифицирани кадри и предоставянето на висококачествени биомедицински услуги в областта на клетъчните биотехнологии и репродуктивната медицина.

## ИЗИСКВАНИЯ КЪМ АВТОРИТЕ:

Списание “Ембриология” е специализирано научно издание на Българска Асоциация по Репродуктивна Човешка Ембриология (БАРЧЕ). В него могат да бъдат публикувани оригинални научни статии и обзори в областта на експерименталната и клинична ембриология и асистираната репродукция. Кратките предварителни съобщения, публикувани в това списание, могат в последствие да бъдат отпечатвани в разгърнат вид и в други научни списания.

Материалите следва да бъдат представяни единствено на електронен носител. Желателно е текстът на статиите да не надвишава 6 страници формат А4 при размер на шрифта 12 и разрядка 1 ред. Препоръчваме илюстрациите да не са повече от 4, да са включени в текста на определените от автора места и да са с максимално висока разделителна способност (формат .tiff или .eps).

Статиите следва да съдържат на български и английски език - заглавие, имена и месторабота на авторите и резюме. Основният текст следва да бъде правилно структуриран и да съдържа следните раздели: въведение, материали и методи, резултати и обсъждане, литературни източници, адрес за кореспонденция. Списъкът на използваната литература да бъде в стандартен формат (автори, наименование на статията, издание, година, том, брой, страници) и да не надвишава 20 автора, подредени по реда на цитиранията в текста.

Всички изпратени материали подлежат на рецензия от страна на редакционната колегия, като могат да бъдат връщани на авторите за корекция и доработка или да бъдат отказвани за публикация.

*Публикуваните материали са лични мнения на авторите и списанието не носи отговорност за тяхното съдържание.*

**За повече информация и изпращане на материали:**

Българска Асоциация по Репродуктивна Човешка Ембриология (БАРЧЕ),  
гр. София 1606, ул. “Константин Иречек” № 17.

E-mail: gnikolov@yahoo.com

plamen.ivf@gmail.com

Тел.: 088 870 3786 (д-р Г. Николов)

088 821 7095 (П. Тодоров)



## **ЧЕСТИТ ЮБИЛЕЙ!**

Наскоро кръгла годишнина навърши нашият колега и приятел Георги Вакрилов.

Д-р Вакрилов е роден през 1958 г. в гр. София. Учи в английската езикова гимназия, а през 1985 г. завършва медицина в МУ-София. През 1983 г. получава специалност „Акушерство и гинекология“.

Георги Вакрилов е един от внедрителите на метода за ин-витро оплождане в България. Повече от 30 години работи в областта на ембриологията. Започва в лабораторията по асистирана репродукция в болница „Света София“, която ръководи в продължение на 22 години. В периода 2010-2012 е ръководител на Вита Ин Витро Център в болница „Вита“, а понастоящем е отговорник направление „Асистирана репродукция“ в СБАЛАГ „Майчин дом“. От 2006 г. работи като ембриолог и в МЦ „София 2000“. Многобройните му успехи са свързани с раждането на първото бебе в България от замразен ембрион, първата двойка близнаци от ин-витро оплождане и редица други.

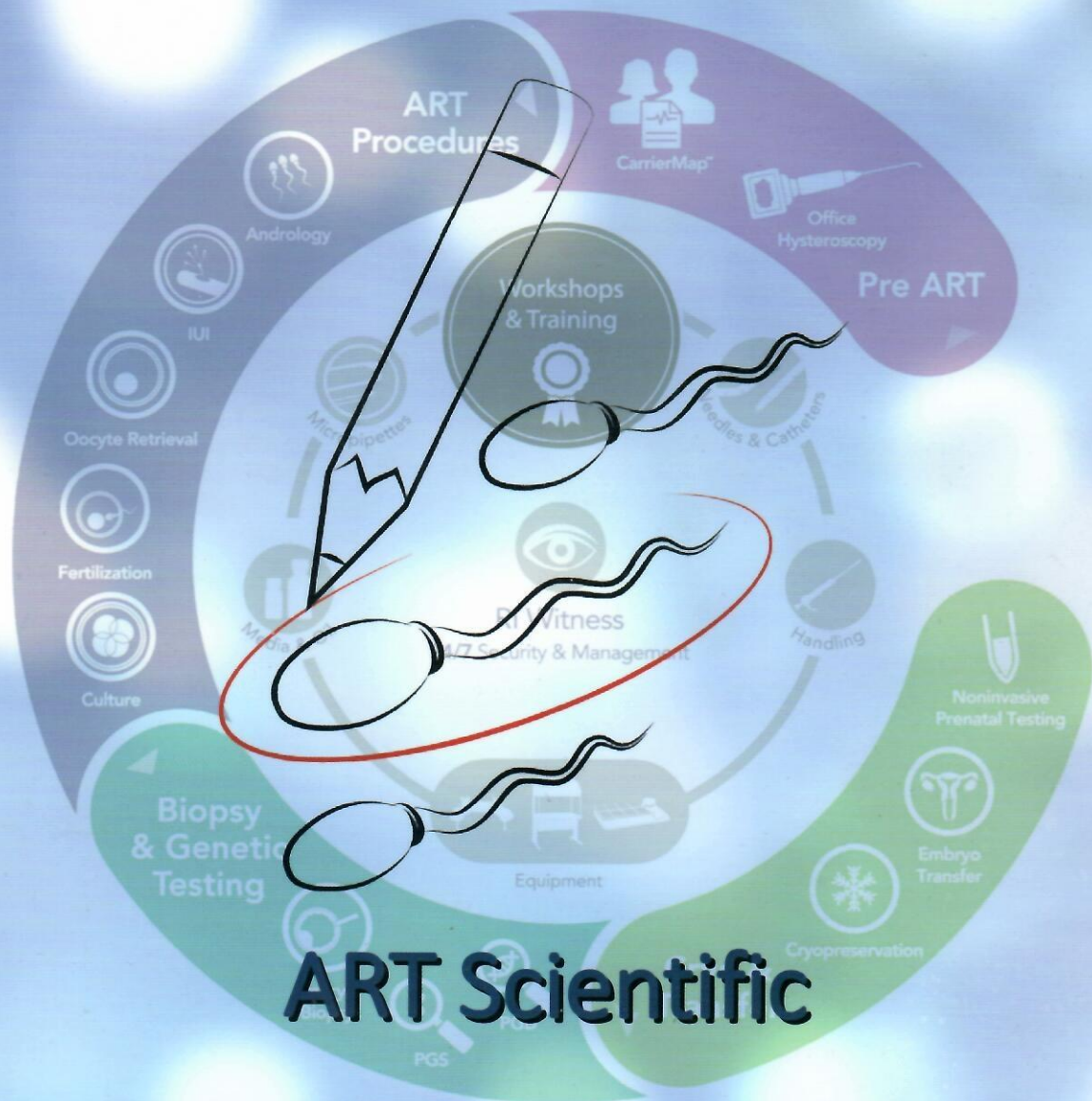
Участвал е в обучението на голяма част от ембриолозите, работещи в България. И до момента продължава да ни помага с ценните си съвети, базирани на богатия му опит и знания.

Д-р Вакрилов е съчредител и дългогодишен член на УС на БАРЧЕ. Активно участва в дейността на асоциацията (включително и в неформалните мероприятия). Членува и в редица други наши и международни асоциации.

От името на всички колеги му честитим юбилея и му желаем много здраве, успехи и още дълги години ползотворна дейност.



## CooperSurgical Fertility Companies



# ART Scientific

*Written by a community of experts in the field, with science at its heart!*

visit and subscribe: [www.origio.com/artscientific/](http://www.origio.com/artscientific/)



**„Young Embryologist“ 2018/2019**  
**Coming soon!**