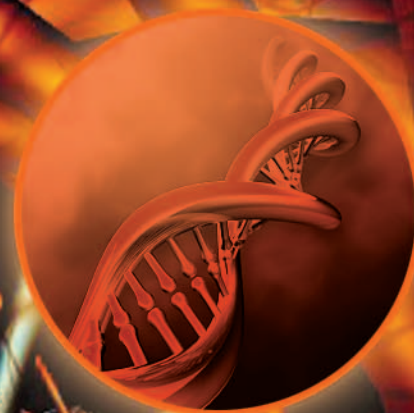


# ЕМБРИОЛОГИЯ

Embryology



ISSN 1312-7349

ИЗДАВА БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ  
ПО РЕПРОДУКТИВНА ЧОВЕШКА ЕМБРИОЛОГИЯ

ТОМ 1 КНИЖКА 2  
2006





# ... А всичко започна с Puregon®

r-FSH, чиято ефективност и ефикасност  
са доказана в практиката стъпка към успеха

- 1997 - за първи път в програмите за асистирана репродукция в България се регистрира и въведе рекомбинантен FSH - PUREGON (follitropin beta)
- 2001 - за удобство и оптимизиране на дозите се въведе PUREGON под формата на готов за употреба разтвор
- 2006 - ОЧАКВАЙТЕ - PUREGON, готов разтвор за ПИСАЛКА С МНОГОКРАТНО ПРИЛОЖЕНИЕ

  
**Puregon®**  
recombinant FSH  
follitropin beta  
Изобразен успех

  
Organon

За повече информация:  
ТРЕЙДКОНСЪЛТ ЕООД, тел.: 02/9158054  
Официален представител и дистрибутор за България

## СЪДЪРЖАНИЕ:

### Микроделециите на Y- Хромозомата и мъжкия инфертилитет,

Д. Гуленова, Г. Николов, Ал. Савов,

И. Кременски.....3

### Хромозомните грешки при ооцити и предимплантационни ембриони - естествена причина за ниската плодовитост при човека,

С. Делимитрева, Р. Живкова, М. Маркова,

И. Ватев.....16

### Получаване, култивиране и използване на човешки ембрионални стволови клетки,

П. Тодоров.....23

## CONTENTS:

### Microdeletions of the Y-chromosome and male infertility,

D. Gulenova, G. Nikolov, A. Savov,

I. Kremensky.....3

### Chromosomal errors in oocytes and preimplantation embryos - A natural cause for low human fertility,

S. Delimitreva, R. Zhivkova, M. Markova,

I. Vatev.....16

### Derivation, culture and application of human embryonic stem cells,

P. Todorov.....23

### Редакционна Колегия:

Д-р Георги Николов - главен редактор;

Пламен Тодоров, дб - зам. гл. редактор

### Членове:

Доц. д-р Иван Николов, дм;

Доц. Росица Конакчиева, дб;

Доц. Янчо Тодоров, дб;

Димитър Баров;

д-р Иво Тодоров, дм;

Десислава Тачева, дб;

д-р Георги Вакрилов;

Диана Гуленова

### Чуждестранни членове:

д-р Владимир Исаченко - Германия

д-р Кристина Магли - Италия

Уважаеми читатели,

Изминаха неусетно 6 месеца от излизането на Първия брой на списание "Ембриология". Не мога да не споделя с Вас своето задоволство от факта, че той бе посрещнат със завидно голям интерес и буквално бе "разграбен" от колегите за няколко седмици. Това ни даде куража в разгара на лятото и морските ваканционни дни, независимо от потискащите горещини, да се захванем с издаването на настоящия брой на списанието.

В него сме включили три обзорни статии, които засягат важни за всички нас проблеми, а именно:

- ролята на микроделециите на Y-хромозомата при мъжкия стерилитет;
- хромозомните грешки като причина за ниската плодовитост при хората;
- получаване, култивиране и използване на човешки ембрионални стволови клетки.

Считам, че въпросните теми са съществени по следните причини:

1. У нас за момента на микроделециите на Y-хромозомата не се гледа с необходимата сериозност, нито по отношение изясняване причините за мъжкото безплодие (на което сме очевидни дръжници), нито по отношение възможността за предаването на тези хромозомни дефекти в мъжкото потомство (особено след въвеждането на ICSI в рутинната практика);

2. В България определено се спекулира с ефективността (резултатността) на методите за асистирана репродукция и по-специално с очакванията от метода "ин витро" фертилизация и трансфер на ембриони; на тазгодишната редовна среща на ESHRE бяха докладвани резултати от световния IVF регистър и там процентите на успеваемост бяха поне 2-3 пъти по-ниски (но реални!) спрямо тиражираните в медиите и от някои ART групи у нас;

3. Около стволовите клетки в световен мащаб, а и в България витае някаква тайнственост, често се спекулира, а както се видя в разразилия се медиен скандал по повод вземането на кръв от пъпна връв (за изолиране и съхраняване на стволови клетки) никому не бе ясно кое е разрешено, кое е регулирано и кое - неетично.

Надявам се, чрез настоящия Втори брой на списание "Ембриология" да спомогнем за изясняване на някои аспекти от тези проблеми.

Д-р Георги Николов,  
(главен редактор)



## БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО РЕПРОДУКТИВНА ЧОВЕШКА ЕМБРИОЛОГИЯ (БАРЧЕ)

### BULGARIAN ASSOCIATION FOR REPRODUCTIVE HUMAN EMBRYOLOGY (BARHE)

Както вече съобщихме в бр. 1 на списание "Ембриология", на 10.11.2005 год. в гр. София бе учредена **БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО РЕПРОДУКТИВНА ЧОВЕШКА ЕМБРИОЛОГИЯ (БАРЧЕ)**. В първите шест месеца след създаването си, дейността на УС на Асоциацията бе съсредоточена върху:

1. Регистрация в СГС и Министерството на Правосъдието;
2. Издаване на БУЛСТАТ;
3. Регистрация в НОИ и ТДС "Красно село";
4. Придобиване на банкова сметка;
5. Подготовка и издаване на Първия брой на списание "Ембриология";
6. Регистриране на Списанието в Национална Библиотека "Кирил и Методий" и получаване на ISSN;
7. Разпространение на Списанието в научните библиотеки на страната, вкл. в МУ - София;
8. Разширяване на членската маса, като бяха приети нови членове от:
  - СБАЛАГ "Св. Лазар" - лаборатория по "Ин витро" оплождане;
  - СБАЛАГ - гр. Варна - център по АРТ;
  - МЦ "Плама" - гр. Пловдивкато понастоящем в Асоциацията са представени девет от петнадесетте центъра по асистирана репродукция в България.
9. Събиране на членския внос за 2006 г.;
10. Участие в обсъждане на промени в закона за трансплантация на органи, тъкани и клетки; Асоциацията, съвместно с БАСРЗ и групите по АРТ, подготви протестно писмо до Парламентарната комисия по здравеопазване и МЗ;

11. Организиране на работна среща за членовете на Асоциацията. Последната се проведе на 15.06.2006 г. от 16.30 ч. в МЦ "РепроБиоМед" - София и бе по проблемите на диагностиката на мъжкото безплодие и по-специално по уеднаквяване на критериите за оценка на качествата на семенната течност. На срещата присъстваха представители на следните центрове по асистирана репродукция:

- МЦ "РепроБиоМед" - София;
- АГ Център "Димитров" - София;
- МЦ "Репродуктивно здраве" - София;
- МЦ "София" - София;
- САГБАЛ "Св. Лазар" - София;
- Ин витро център "Братя Тодорови" - София
- МЦ "Плама" - гр. Пловдив;

На работната среща бяха обсъдени методите за оценка качеството на семенната течност, бяха направени спермограми на 5<sup>??</sup> различни мъже от всеки от присъстващите, като резултатите бяха сравнени, а получените различия бяха дискутирани. Стана ясно, че разликите в критериите за оценка на семенната течност в отделните АРТ-центрове е в рамките на +/- 10%. На всички присъстващи бе издаден сертификат за участие и лична работна чанта с документи.

П. Тодоров,  
Секретар на БАРЧЕ

## МИКРОДЕЛЕЦИИТЕ НА Y-ХРОМОЗОМАТА И МЪЖКИЯ ИНФЕРТИЛИТЕТ

Д. Гуленова\*, Г. Николов\*, Ал. Савов\*\*, И. Кременски\*\*

\* Сектор по Асистирана Репродукция, МЦ "РепроБиоМед" ООД - София

\*\* Национална Генетична Лаборатория, СБАЛАГ "Майчин Дом" ЕАД - София

## MICRODELETIONS OF THE Y-CHROMOSOME AND MALE INFERTILITY

D. Gulenova\*, G. Nikolov\*, A. Savov\*\*, I. Kremensky\*\*

\* Department of Assisted reproduction, Medical centre "ReproBioMed" Ltd., Sofia

\*\* National Laboratory of Genetics, University Ob/Gyn Hospital "Maichin dom", Sofia

**Резюме:** Около 15% от двойките, опитващи се да заченат дете, са инфертилни, като в поне половината от случаите това се дължи на причини от страна на мъжа. Най-честите от тях са варикоцеле (36%), антиспермални антитела (4%), инфекции (1%) и много други. В над 50% от клиничните случаи етиологията на мъжкия стерилитет е неизвестна. През последните години се обръща по-съществено внимание на потенциалния генетичен произход на инфертилитета. Събраните за момента доказателства сочат, че голям процент от пациентите с идиопатичен стерилитет, с тежка форма на олигоспермия и азооспермия, притежават микроделеции в различни региони на Y-хромозомата, където са разположени гените, свързани със сперматогенезата. Диагностицирането на Y-хромозомните делеции се осъществява чрез полимеразна верижна реакция (PCR). Прилагането на мултиплексна PCR позволява едновременното изследване на детерминирани делеционни интервали на Y-хромозомата.

С техниките на Асистирана репродукция, и по специално с интраовоцитното инжектиране на сперматозоиди (ICSI), се предлага възможност за преодоляване на мъжкия стерилитет и зачеване на дете дори и при пациенти с тежки сперматогенни нарушения. Такъв фертилизационен процес, обаче, крие риск от предаване на генетичния дефект в мъжкото потомство. Поради това, молекулярния анализ на Y-хромозомата и генетичното консултиране са от съществено значение за лекуваната двойка.

**Abstract:** Around 15% of the couples trying to conceive are affected by infertility with male causes alleged in at least half of the cases. Among the known male factors leading to infertility by far the most common is varicocele (36%), followed by anti-sperm antibodies (4%), infections (1%) and others. In more than 50% of the clinical cases the etiology of man's subfertility is unknown. In the last two decades more and more attention is drawn to the potential genetic background of infertility. A lot of evidence has been collected recently that a high percentage of idiopathic patients with azoospermia and severe oligospermia possess microdeletions at different regions on the Y-chromosome where genes associated with spermatogenesis are located. The diagnostic testing of deletions is performed by PCR (Polymerase Chain Reaction). Using multiplex PCR allows the simultaneous investigation of determined deletional regions on the Y-chromosome.

Assisted reproduction techniques, including intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI), offer the possibility to infertile males, even to those with severe spermatogenic failure, to conceive children. However, such fertilization process carries the risk of transmission of the genetic defect to the male offspring. Therefore, molecular analysis of the Y-chromosome and genetic counseling are crucial for treated couples

Възможността за забременяване при една фертилна двойка, която води редовен полов живот и не прилага контрацепция е средно около 20 % през всеки менструален цикъл. При повечето случаи зачеването се извършва в рамките на 24 месеца. Инфертилитета засяга около 15% от двойките в детородна възраст, като при една четвърт от тях съществува повече от един фактор, водещ до неспособност за забременяване; в 50% от случаите причините са от страна на мъжа <sup>(1)</sup>.

## I. ПРИЧИНИ ЗА СТЕРИЛИТЕТ ПРИ МЪЖЕТЕ

1. Отклонения в количествените и качествените показатели на спермата:

Според съвременните критерии, приети от СЗО (1999 г.), за нормоспермия говорим, когато в прясно еякулирана семенна течност са налице стойностите на показателите в табл.1.

Отклоненията от нормалните параметри на семенната течност (**нормоспермия**) могат да бъдат за сметка на намален обем (**олигоспермия, хиповолемия**); намалена концентрация и/или общ брой (**олигозооспермия**); лоша / слаба (**астенозооспермия**) или липсваща (**акинетозооспермия**) подвижност; лоша морфология (**тератозооспермия**) и др., както и да се комбинират (напр. ОАТ - олигоастенотератозооспермия). Причина за настъпването им може да са някои от следните състояния:

възпалителни процеси, инфекциозни болести (вирусен паротит);  
ендокринни отклонения;  
имунологични отклонения (антиспермални антитела);

фактори, свързани с начина на живот и условията на средата (вредности и абзузи);  
генетични болести;

2. *Анатомични отклонения:*

Обструкциите на гениталния тракт могат да бъдат причина за инфертилитет. Те могат да се дължат на конгенитални или генетични дефекти.

3. *Митохондриални делеции:*

Промени или делеции на митохондриалните гени могат да доведат до редица заболявания включително и до стерилитет.

Някои от **рисковите фактори**, свързани със стерилитет при мъжете, са следните:

претърпяване на генитални инфекции или травма (операция) на тестисите;  
твърде ранен или късно проявил се пубертет;  
излагане на токсични вещества или рискове при работа (кадмий, живак и др. тежки метали; винилхлорид; йонизираща радиация; висока температура и др.);  
пушене на цигари или марихуана,  
прекалена консумация на алкохол;  
ингинална / феморална херния;  
малдесцензус на тестисите (крипторхизъм);  
прием на някои лекарства (напр. симетидин, химиотерапевтици, хормони);  
заушка (вирусен паротит) и др.;  
в повече от 50% от случаите, инфертилитета при мъжете е с **неизяснен произход** (идиопатичен).

Таблица 1

Нормални стойности на променливите показатели в сперма	
Обем	> 2.0 ml
Концентрация	> 20,000,000 / мл
Подвижност	> 50 % с добра прогресия
Морфология	> 50% * > 30% ** > 15% ***
БКТ	< 1,000,000 / мл
Спермални антитела (Immonobead tests)	< 50% сп. с полепнали частици
* Световна Здравна Организация (СЗО), 1987 ** СЗО, 1992 *** СЗО, 1999 - според "стриктни критерии" на Kruger (Tygerberg)	





3. AZF (Azoospermia factor) е участък от дългото рамо на Y-хромозомата, дефиниран за първи път от Tierpolo и Zuffardi [1976]. Смята се, че неговата липса е свързана с някои случаи на мъжки инфертилитет - азооспермия или тежка форма на олигоспермия. Първото убедително доказателство за това, че нарушения в сперматогенеза се причиняват от цитологично неустановими делеции на Y-хромозомата е произлязло от идентифицирането на две неприпокриващи се микроделеции, картирани в дисталния регион на интервали 5 и 6 (фиг. 4) при двама азооспермични мъже <sup>(3)</sup>.

AZF е локализиран в делеционните интервали 5 и 6 на Y- хромозомата. Големината му е около 500 Kb. AZF е разделен на три дискретни, неприпокриващи се региона - AZFa, AZFb, AZFc. Съществува още един регион - AZFd, разположен между AZFb и AZFc <sup>(4)</sup>.

В AZF регионът са локализирани няколко гена, свързани с мъжкото безплодие (DAZ, RBM, DFFRY и други). Много от тях кодират протеини, участващи в пост-транскрипционната генна експресия и поради това се предполага, че са свързани с процеса на зреене на сперматозоидите. Многобройни Y-гени, експресирани в човешките тестиси са картирани в съответните AZF райони. Най-малко един от тях трябва да е функционално активен в процеса на сперматогенеза. Мутации в този ген най-често се свързват с азооспермия.

### III. Y - МИКРОДЕЛЕЦИИ

1. *Определение:* делециите в Y- хромозомата представляват загуба на малки участъци в еухроматиновия регион на дългото рамо на Y-хромозомата (Yq11), които не могат да се установят с конвенционален цитогенетичен анализ. Предполага се, че там се разполагат гени, участващи в сперматогенезата. След проведени проучвания е установено, че микроделециите се срещат приблизително при около 7.3% от инфертилните мъже <sup>(5)</sup>.

2. *Честотата* на делециите е в зависимост от степента (тежестта) на нарушението в показателите на семенната течност; така например при мъжете с азооспермия се срещат в 66% от случаите, по-рядко при мъже с тежка олигоспермия и концентрация на сперматозоидите  $< 5 \times 10^6 / \text{ml}$  (28%), и спорадично при мъже с концентрация  $> 5 \times 10^6 / \text{ml}$ . По литературни данни честотата в популация на субфертилните мъже варира в доста широк

интервал между 1% и 55% <sup>(6)</sup>, като вариациите вероятно са дължат на селекционните критерии за пациентите.

Важно е да се отбележи в по-синтезиран вид, че:

Yq делециите се срещат изключително при мъже с концентрация на сперматозоидите  $< 5 \times 10^6 / \text{ml}$  и особено при тези с  $< 1 \times 10^6 / \text{ml}$ ; Делециите са много рядко явление при мъже с концентрация на сперматозоидите  $> 5 \times 10^6 / \text{ml}$  (приблизително 0.7%);

Най-често засегнатия регион е AZFc (приблизително 60%), следван от делеции в AZFb и AZFb+AZFc или AZFa+AZFb+AZFc (35%), докато делеции в AZFa региона настъпват изключително рядко (5%);

Изолирани генно-специфични делеции са изключително редки;

Делеции могат да бъдат открити независимо от съпътстващите абнормни андрологични находки (7%) като варикоцеле, крипторхизъм, хипогонадотропен хипогонадизъм, обструктивна азооспермия и други.

3. *AZF делециите* са съвместими със сперматогенеза, но тя е понижена и получените сперматозоиди носят мутантната Y-хромозома. Както вече бе отбелязано, налице е следната зависимост - колкото по-малък е броя на сперматозоидите, толкова по-висока е честотата на делециите. Има две възможни обяснения на въпроса как подобни Yq -делеции причиняват такъв обхват от сперматогенни отклонения.

Според първата хипотеза природата на сперматогенните отклонения се определя единствено от делетирането на участъци в AZF региона и *степента на засягане зависи от това кой ген или гени в кластера липсват*. Според тази хипотеза тежестта на сперматогенните отклонения би следвало да корелира директно с големината на делециите. Практически такава връзка, обаче, не е установена. Напротив - делециите, открити при олигоспермици в някои случаи дори са по-големи от тези при азооспермиците със SCOS (Sertoli Cell-Only Syndrome - аплазия на герминативните клетки);

Случайни фактори, фактори на средата или гени извън AZF модифицират ефектите на AZF делециите. Тежката форма на олигоспермия, абсолютното блокиране на зреенето на сперматогенните



клетки и SCOS не са етиологично определени, а представляват **клинично разнообразие на една и съща прилежаща генетична аномалия.**

4. **Гени и функционални участъци върху Y - хромозомата** - някои от по-важните гени са:

**А. ZFY - гена** е разположен в близост до PAR1 (Pseudo Autosomal Region). Кодира протеин от типа "цинкови пръсти" (Zinc - finger protein), който се състои от 801 аминокиселини. Функционалната му роля вероятно е свързана с активиране на транскрипцията.

**Б. SRY - гена** е отговорен за мъжкия фенотип (*sex determining region on Y*).

Първите предположения, че Y-хромозомата участва в детерминирането на мъжкия пол са направени след откритието, че XY и XYY (Синдрома на Клайнфелтер) мъже развиват тестиси, а XX и XO (синдрома на Търнър) жени развиват яйчници [Jacobs and Strong, 1959].

При по-късни изследвания е показано, че XX мишки изявяват мъжки фенотип, когато носят малка част от Y-хромозомата. Това е довело до предположението, че основния ген, включен в определянето на мъжкия пол се носи от Y-хромозомата. Той е основен ген, регулиращ каскада от реакции, свързани с детерминирането на тестисите.

**В. AZF - гени** - тези гени могат да се класифицират основно в две групи :

гени, експресирани в много органи (house-keeping genes) с X-хомолози, които избягват X-инактивиране;

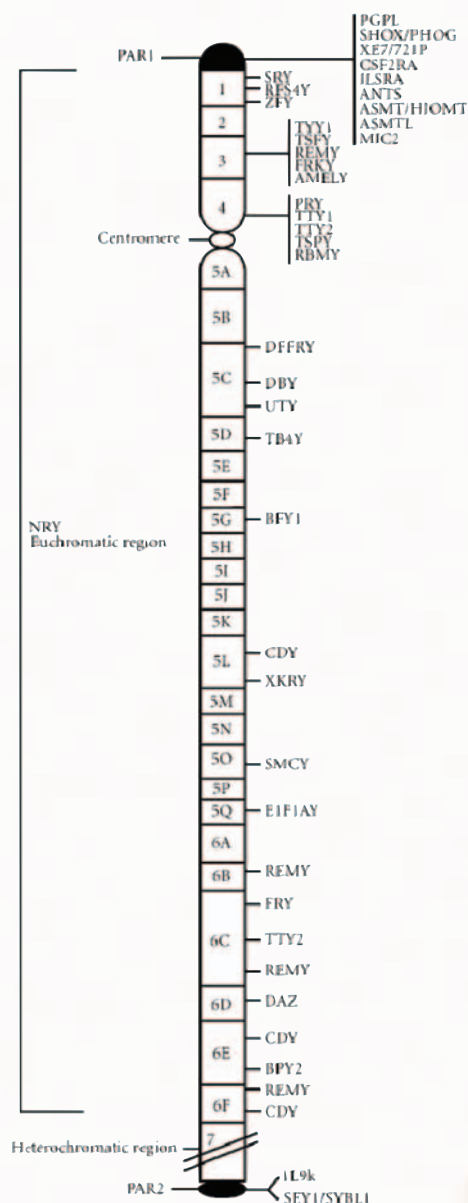
гени с потенциална роля във фертилността, експресирани специфично в тестисите и без X- хомолози;

Предполага се, че втората група гени са свързани с инфертилитет, причинен от делеции в Yq11.

Предполагаемият пълен генен състав на всеки AZF регион вече е идентифициран <sup>(7)</sup>. Регистрирани са 31 Y-гена, експресирани в тестисите и локализирани в един от AZF делеционните интервали.

Подразделят се група от на 14 протеин-кодиращи гени с вече известни функции и група от 17 Y-гена с все още не дотолкова познати функции <sup>(8)</sup>.

Фигура 4: Карта на Y-хромозомата при човека



**AZFa - гени:** около 1-2% от Y-хромозомните делеции обхващат AZFa региона. Гените в този участък са: DFFRY (Drosophila fats facets related Y) (или USP9Y) и DBY <sup>(9)</sup>.

**AZFb - гени:** RBM (RNA-Binding Motif, наречен още YRRM) ; CDY -хромодомен Y (Chromodomain Related Y), XKRY и други;

**AZFc - гени:** AZFc съдържа генен кластер на мултикопийното генно семейство на DAZ гена (*Deleted in Azoospermia*). DAZ гена има тестисно-специфична експресия. Повечето мъже с делеции в AZFc (респективно DAZ гена) са по-често олигоспермици. Делециите могат да са свързани с разнообразен фенотип, включително нормална фертилност.

5. *Произход на микроделециите.* По-голямата част от Y- делециите настъпват като *de novo* мутации. Клетъчния произход на делециите все още не е изяснен. Тестикуларния произход изглежда най-вероятен, въпреки че делеции могат да се открият и в оплодени яйцеклетки или ембриони. Те биха възпрепятствали образуването на сперматогонии във фетуса и следователно да нарушат сперматогенезата при възрастния индивид. Мозаицизмът в герминативните клетъчни линии обяснява откриването на Y-делеции при направено изследване върху две момчета, заченати чрез ICSI. Делеции не са открити в лимфоцитите на инфертилните им бащи.

6. *Механизъм на възникване на Y-делециите.* Високата честота на настъпването на Y-делеции предполага, че Y-хромозомата е податлива на спонтанна загуба на генетичен материал. Природата на механизма остава все още неизяснена.

Една от възможностите е настъпването на неправилни рекомбинационни явления между участъци с хомология или подобни повторени секвенции между X- и Y-хромозомите или вътре в самата Y-хромозома чрез небалансиран обмен между сестринските хроматиди. Нестабилността на Y-хромозомата може да е свързана и с високата честота на повторените елементи по дължината ѝ. Предполага се, че има специфична организация на Y-хромозомни последователности, която спомага за формирането на AZF делеции. Следователно някои индивиди биха били по-податливи към формирането на делеции от други.

Има хипотеза, според която делеции настъпват по време на рекомбинация между дублицираните последователности, фланкиращи критичния ген. Двата региона - AZFb и AZFc съдържат общо 24 гена, повечето от които са многокопийни. Пълното делетиране на AZFb е резултат от хомоложна рекомбинация между палиндромите P5/и проксималната част на P1.

Според последни проучвания е създаден нов модел, обясняващ настъпването на микроделециите. Според него двата региона AZFb и AZFc се припокриват. AZFb и AZFbc делециите се предполага, че са следствие от най-малко три различни делеционни модела<sup>(10)</sup>. Пълното делетиране на AZFc (най-честите делеции на Y-хромозомата) е резултат от хомоложна рекомбинация между ампликони b2 и b4 в палиндроми P3 и P1<sup>(11)</sup>.

7. *Връзка на микроделециите с клиничния фенотип.* Молекулярният анализ на AZF в Y-хромозомата при мъже с идиопатична азооспермия е добър прогностичен метод за установяване наличието на зрели сперматозоиди в тестикуларната тъкан на пациенти без нужда от екстракция на биопсиен материал за изследване. Изследването на пациенти, които имат AZFa, AZFb, AZFc делеции разкрива голяма вариация в природата и степента на сперматогенните нарушения.

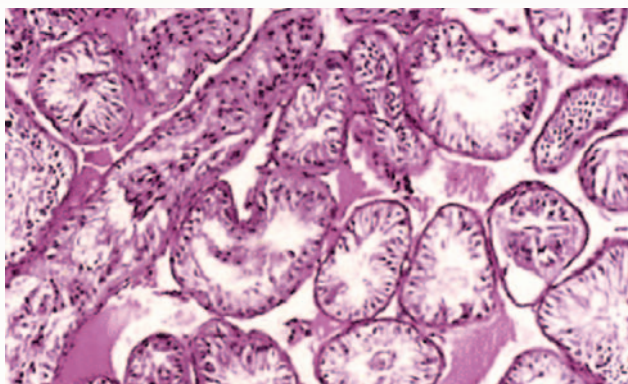
Пациентите с пълно делетиране на AZFa и AZFb обикновено страдат от пълна липса на зародишни клетки (AZFa) или на пост-мейотични зародишни клетки (AZFb). При такива случаи не се препоръчва TESE за ICSI, защото обикновено са без успех<sup>(12)</sup>.

Ако са настъпили частични AZFb и AZFc делеции или е диагностицирано пълното делетиране на AZFc региона, то често се откриват зрели сперматозоиди в тестисите (50% от случаите) - най-малко в единични семенни каналчета, поради това, че резидуалната локална сперматогенеза е типична за такъв тип пациенти, като също е възможно наличието на зрели сперматозоиди в еякулата (криптозооспермия)<sup>(13)</sup>.

**Делеции в AZFa региона** най-често са свързани с азооспермия, представена със SCOS (Sertoli-cell only syndrome) и по рядко с олигоспермия. SCOS се характеризира с липса на зародишни клетки в семенните каналчета (фиг. 5), малки тестиси, повишено ниво на FSH и нормално ниво на тестостерона. Описани са два SCOS фенотипа :

- SCOS I - напълно липсват зародишни клетки при хистологичен пререз в семенните каналчета.
- SCOS II - развива се в по-късен стадий от диференцирането като вторичен ефект от първичен дефект, засягащ сперматогенезата.

Фигура 5 SCOS (увел. 150x)





- Делеции в AZFb региона са свързани с блокиране на сперматогенезата на ниво сперматоцит (Spc) (spermatogenic arrest - SGA). Проявява се с азооспермия, тежка до лека форма на олигоспермия и нормоспермия.

Делеции в AZFc региона са свързани със SCOS II - присъстват малко на брой сперматогонии (Spg); проявява се от азооспермия, тежка до лека форма на олигоспермия и продуциране на недостатъчно зрели сперматозоиди. Възрастта има важна роля за фертилността. Установено е, че при пациенти с AZFc делеции страдащи от олигоспермия, с нарастване на възрастта се достига до азооспермия.

Честотата на Y-микроделециите в българската популация не е определена точно, поради твърде ограничената извадка. До момента има регистрирани 4 случая на пациенти с микроделеции. Всички те са в локус "с" на AZF региона. Пациентите са с диагноза тежка олигоспермия или азооспермия <sup>(14)</sup>.

#### IV. АСИСТИРАНИ РЕПРОДУКТИВНИ ТЕХНОЛОГИИ И ПРЕОДОЛЯВАНЕ НА МЪЖКИЯ СТЕРИЛИТЕТ

Техниките на Асистирана репродукция като вътрематочна инсеминация (IUI), "ин витро" фертилизация с/без микроманипулация на гамети (IVF, респ. ICSI) терапевтично зависят от

андрологичния профил на пациента. Приложението на тези техники предизвиква оживени дискусии относно значимостта и прогностичната стойност на минималните изисквания към андрологичните критерии.

До 1992 г. единствената алтернатива за двойки с тежък мъжки фактор е била осиновяване на дете или използването на донорска сперма. През 1992 г., белгийска изследователска група представя революционна техника за преодоляване на тежката форма на мъжки стерилитет чрез инжектирането на един сперматозоид в цитоплазмата на овоцита - ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) <sup>(15)</sup>.

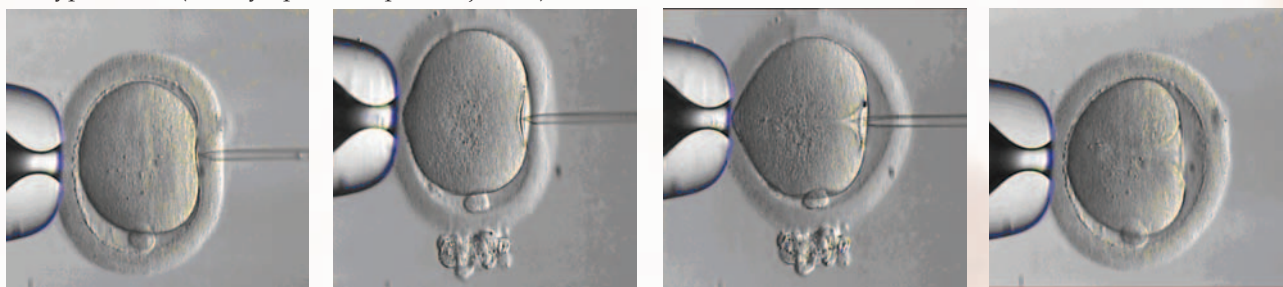
Оплождането се извършва с микроманипулатор под микроскопско наблюдение. Сперматозоиди могат да бъдат изолирани както от еякулат, така и след тестикуларна биопсия (TESE) или от надсеменник (epididymis) - (MESA). При взимането на биопсичен материал може да се установи дали азооспермията се дължи на нарушения в продуцирането на сперматозоиди или на обструкция.

Индикациите за прилагане на ICSI са следните:

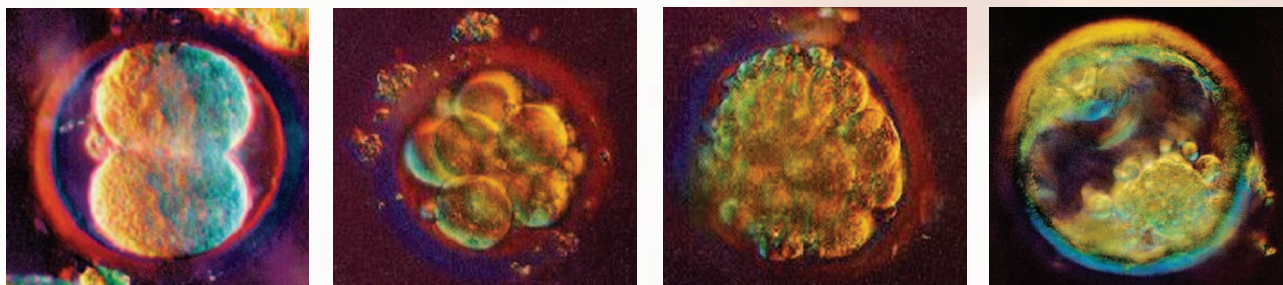
- Тежка олигоспермия
- Нарушения при акрозомалната реакция
- Тератозооспермия
- Пациенти с рак на тестисите
- Неоплождане при IVF
- MESA, TESE

Навлизането на ICSI, като начин за преодоляване

Фигура 6 ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection)



Фигура 7 Ембрион в различен етап от развитието си



1. Стадии 2 клетки (25-30 h. след оплождането)

2. Стадии 8 клетки (66-70h. след оплождането)

3. Стадии морула (76-80h. след оплождането)

4. Стадии бластоциста (5 дни след оплождането)

на инфертилитета, налага да се вземе под внимание факта, че AZF делециите могат да се предадат в поколението чрез тази процедура и да причинят инфертилитет в мъжкото потомство. Вертикалното предаване на AZF дефектите на децата от мъжки пол чрез ICSI е представено като статус на Y-хромозомата поради това, че инфертилитета се предава на синовете и води до подобна симптоматика. Поради тази причина, при всички случаи на азооспермия и тежка олигоспермия, е препоръчително да се направят изследвания върху Y-хромозомата, както и генетично консултиране преди предприемането на асистирана репродукция.

#### **Изследване на Y-хромозомни делеции в ICSI поколението**

Установено е, съществуването на микроделеции върху дългото рамо на Y-хромозомата не засяга негативно оплождането или крайните резултати (% на забременяване), нито при мъжете с тежка форма на олигозооспермия, нито при тези с азооспермия, от които успешно е получен семенен материал (TeSE, MESA) <sup>(16)</sup>.

Много често Y-делециите в по-голямата си част се дължат на *de novo* мутации. Фертилните бащи на инфертилните мъже не притежават Y-делеции. Мъжкото поколение с Y-делеции, заченати чрез ICSI, притежава същите Y-хромозомни делеции, както тези на бащите, като те са предадени без амплификация или промяна. При наличие обаче на тестикуларен мозаицизъм е възможно раждането и на здрави синове, без Y-хромозомни делеции.

Трябва да се има предвид при консултирането на двойки с тежка олигозооспермия или необструктивна азооспермия, желаещи да се подложат на ICSI, че делеции в AZFc региона на Y-хромозомата са най-често генетично дефинираната причина за сперматогенни нарушения. При прилагане на ICSI при пациенти с AZFc делеции е установено, че предаването им в поколението е 100% <sup>(17)</sup> т.е. синовете на AZFc пациентите също ще страдат от субфертилитет. **При наличие, обаче, на тестикуларен мозаицизъм е възможно раждането и на здрави синове, без Y-хромозомни делеции.**

От една страна около 2% от ICSI поколението се очаква да унаследи инфертилитета на бащата, а от друга децата родени до момента след ICSI засега са все още твърде малки, за да се установи тяхната фертилност или да се извърши спермален анализ.

## **V. ИНДИКАЦИИ ЗА ДИАГНОСТИЦИРАНЕ**

Не съществуват абсолютни критерии, според които да се определи кои пациенти са подходящи за молекулярен анализ. Възрастта има важна роля за фертилността. Установено е, че при пациенти с AZFc делеции, страдащи от олигоспермия, с нарастване на възрастта се достига до азооспермия. Пациенти, участващи в ICSI могат да се разглеждат като подходяща група за извършване на делеционен скрининг, поради факта, че микроделециите се предават на мъжкото потомство при прилагане техниките за Асистирана репродукция. Друга група пациенти, подходящи за изследване на микроделеции са мъже с неизяснени причини за стерилитета.

## **VI. ИЗСЛЕДВАНИЯ И МЕТОДИКИ**

### **1. PCR - полимеразната верижна реакция:**

Молекулярен анализ чрез цитогенетична флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) не е подходящ за идентифицирането на такъв тип микроделеции. За откриването на микроделеции с размери от няколко десетки до хиляди бази се използва молекулярната техника Polymerase Chain Reaction (PCR - полимеразна верижна реакция). Диагностицирането на Y-хромозомните микроделеции се извършва чрез *мултиплексна полимеразна верижна реакция (PCR)* на геномна ДНК.

PCR е основен метод, използван в молекулярната биология и молекулярната диагностика. Състои се от *in vitro* ензимно намножаване (амплификация) на избрани нуклеотидни последователности, ограничени от известни секвенции. Това са STS's (*Sequence-tagged sites*) - секвенции от 200 - 500 bp, които са уникални в генома. Те могат специфично да се установяват с PCR в присъствие на други геномни секвенции. STS's дефинират специфични позиции от физическата карта. За изследване на Y-хромозомата за наличие на микроделеции са използвани три двойки праймери за локусите AZFa (sY84, sY86), AZFb (sY127, sY134) и AZFc (sY254, sY255) <sup>(18)</sup>.

**2. Етапи на изследването:** Полимеразната верижна реакция започва с първоначална продължителна денатурация, която цели разделянето на двойноспиралната верига на геномната ДНК. Амплифицирането на желания участък се осъществява при условия на многократно повтаряне на серия от цикли с определена



температура, всеки от които включва следните три стъпки:

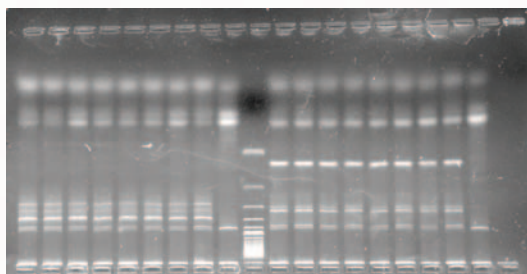
**Термична денатурация (*denaturation*):** При 90 до 97°C се осигурява пълно разделяне на двойноверижната ДНК до едноверижни матрици на амплификацията;

**Хибридизация (*annealing*):** Осъществява се между праймерите и комплементарните им участъци от матричната едноверижна ДНК. Температурата на това взаимодействие е строго специфична и се изчислява в зависимост от базовия състав и дължината на използваните праймерни секвенции;

**Нарастване (*extension*):** Синтезирането на нова, комплементарна на матричната, ДНК верига е в посока 5' 3'. Температурата на този етап се определя от особеностите на използвания ензим - тя осигурява най-високата ДНК-полимеразна активност на ензима. Обикновено тази температура е около 72°C.

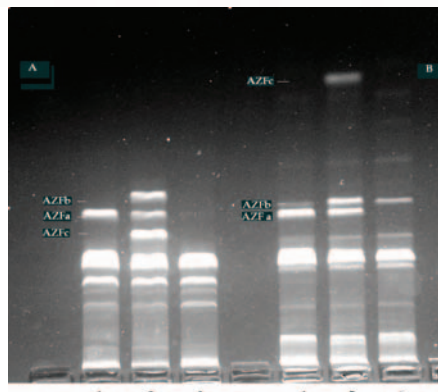
3. **Хоризонтална (агарозна) гел-електрофореза:** Хоризонталната нисковолтова агарозна гел-електрофореза дава възможност ДНК - фрагментите да се разделят по молекулната си маса. Тази техника е използвана за определяне на качеството и количеството на амплификационните продукти. Визуализирането на ДНК фрагментите се осъществява с помощта на UV - светлина и разтвореният в агарозния гел етидиев бромид, който се интеркалира между базите в молекулата.

Фигура 8а Снимка на агарозен гел с разделени ДНК фрагменти, продукт на мултиплексна PCR;



- 1-8 мултиплексна реакция А с праймери sY86, sY127, sY254 (мъже);
- 9 контрола (жена);
- 10 молекулярен маркер;
- 11-18 мултиплексна реакция В с праймери sY86, sY134, sY255(мъже);
- 19 контрола (жена);

Фигура 8б Агарозен гел с разделени ДНК фрагменти, продукт на мултиплексна PCR реакция



1. Del AZFc + Del AZFb при изследване на проксималните AZFa,b,c локуси (мъж)
2. Изследване на проксималните AZFa,b,c локуси (мъж) - норма
3. Контрола - жена
4. Del AZFc + Del AZFb при изследване на дисталните AZFa,b,c локуси (мъж)
5. Изследване на дисталните AZFa,b,c локуси (мъж) - норма
6. Контрола - жена

## VII. КЛИНИЧНО ЗНАЧЕНИЕ НА Yq-ДЕЛЕЦИИТЕ

Идентифицирането на Y- делеции има диагностична, прогностична и превантивна стойност. При мъже с азооспермия, пълното или частично делетиране на AZFa или AZFb има негативно прогностично значение за извличане на сперматозоиди от тестикуларна тъкан (TESE) <sup>(19)</sup>. При пациенти с олигоспермия, които са с повишен риск от прогресивно намаляване на концентрацията на сперматозоидите с времето, криоконсервацията на сперматозоиди би предпазила от прилагане в бъдещето на инвазивни техники като TESE/ICSI <sup>(20)</sup>.

## VIII. ГЕНЕТИЧНА КОНСУЛТАЦИЯ

Генетичното консултиране е от основно значение, с оглед предоставяне на информация за възможния риск от създаването на инфертилни синове.

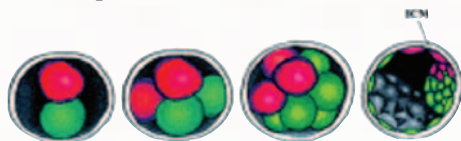
Установено е, че сперматозоидите на пациенти с Yq-делеции са напълно фертилни и при двете процедури на АРТ - IVF и ICSI, както дори и за нормално оплождане. Но въпреки това, не е ясно дали степента на оплождане и ембрионалното развитие са сравними със същите при мъже без делеции <sup>(21)</sup>. След настъпване на бременност Y-делециите задължително се предават в мъжкото потомство.

Фенотипът на синовете може да варира значително, като степента на сперматогенните нарушения не може да бъде предсказана напълно, поради различния генетичен "background" и наличието или липсата на фактори на средата с потенциален токсичен ефект спрямо фертилността.

Установено е, че значителна част от сперматозоидите на мъже, притежаващи Y-делеции, са нулизомни по отношение на половите хромозоми <sup>(22)</sup>. Това означава, че съществува потенциален риск за потомството от развитие на Синдром на Търнър (45, XO), както и други фенотипни аномалии, като мозаицизъм по отношение на половите хромозоми и развитие на недефинирани гениталии.

Скринингът на Y-хромозомни микроделеции при пациенти, носещи мозаичен кариотип 46 XY/45 XO с полово неопределеност и/или Синдром на Търнър, показва значително висока честота на AZFc делеции (33%) <sup>(23)</sup>. По тези данни може да се предположи, че някои Yq-микроделеции са свързани с изцяло Y-хромозомна нестабилност, водеща до формирането на 45, XO клетъчни линии. За да се избегне трансферирането на ембриони с полово хромозомен мозаицизъм на двойката се предлага предимплантационна генетична диагностика (PGD).

Фигура 9 Ембрион с клетъчна мозаичност.

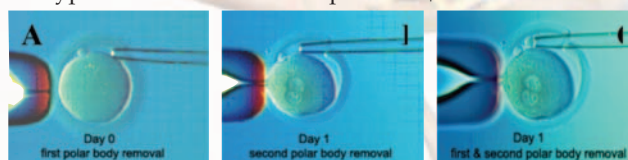


PGD е нова форма на пренатална диагностика, при която ембрионите се изследват за наличие на генетични отклонения преди забременяване. Тя може да се извърши върху клетки в различен етап от развитието на ембриона (или върху полярни телца на овоцитите). Вариантите са следните:

1. Върху овоцит:

преди оплождането (с експулсирано първо полярно телце) и след оплождането на етап два пронуклеуса (2PN) с експулсирано второ полярно телце (PB);

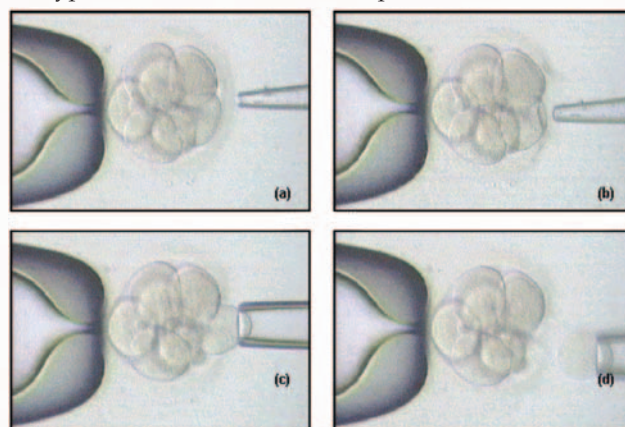
Фигура 10 Биопсия на полярни телца



A - Биопсия на първо полярно телце,  
B и C - биопсия на второ полярно телце и 1PB+2PB;

2. Върху бластомери от ембрион на 3 ден от развитието си (> 6-8 клетки);

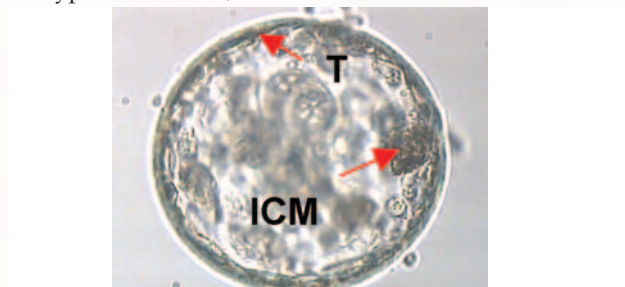
Фигура 11 Биопсия на бластомери



Биопсия на един бластомер от ембрион на 3 ден от развитието си (>6-8 клетки);

3. На етап бластоциста - клетки от ICM (Inner Cell Mass) или клетки на Т (трофобласт);

Фигура 12 Бластоциста



Двете най-често използвани техники в предимплантационната диагностика са FISH (флуоресцентна *In situ* хибридизация) и PCR (полимеразна верижна реакция). Освен тях в момента се развиват техники като пълна геномна амплификация и сравнителна геномна хибридизация - CGH (Comparative Genomic Hybridization). PGD дава възможност за оптимално селектиране на генетично здрави ембриони, подходящи за последващ трансфер в жената.



До септември 2002 г. са родени 331 бебета след прилагането на техника наречена Микросортиране (MicroSort). Чрез нея е възможно разделянето на сперматозоиди, носещи X и Y-хромозома. Микросортирането може да се използва за предпазване от предаване в поколението на X свързани заболявания, фамилно балансиране и други.

По получени резултати е установено, че успеваемостта при сортиране за получаването на сперматозоиди с женската полова хромозома (X) е 91%, а при сортиране по отношение на сперматозоиди носещи Y-хромозома е 78%.

## ОБОБЩЕНИЕ

Изясняването на етиологията на мъжкия стерилитет е от особено значение както за преодоляването на проблема, така и за оценка на риска от предаване в потомството поради участието на различни генетични фактори. Присъствието на Y-хромозомни делеции не намалява оплодяемостта или процента на забременяване от мъжете с азооспермия или тежка форма на олигоспермия (< 2.10<sup>6</sup> mil/ml).

Съотношението между двата пола на родените деца е приблизително еднакво като те са кариотипно нормални. Въпреки това, обаче Y делециите и съответно мъжкия стерилитет се предават на мъжкото потомство (честотата им е приблизително 10% при мъжете с азооспермия и тежка олигоспермия) <sup>(24)</sup>.

Натрупването на достатъчно информация за генетичната патология и връзката и с конкретни клинични фенотипи ще помогне за изясняването функцията на гените, участващи в регулацията на репродуктивната система при мъжете.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dada R., Gupta N. et al., (2003), "Molecular screening for Yq microdeletion in men with idiopathic oligozoospermia and azoospermia", *J. Biocsi*, 28;
2. Tiepolo E. and Zuffardi, O., (1976); " Localization of factors controlling spermatogenesis in nonfluorescent portion of the Y chromosome long arm", *Human Genetics*, 34 119-124.
3. Ma K., Sharkey A., Vogt P., Keil R., Hargreave TB, (1992); "Towards molecular localization of the AZF locus: mapping of microdeletions in azoospermic men within 14 subintervals of interval 6 of the human Y chromosome", *Human Molecular Genetics*, 1 29-33.
4. Kent-First M., Muallem A., Shultz J., (1999), "Defining regions on Y chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y chromosome microdeletion detection"; *Molecular Reproduction and Development* 53 27-41;
5. Simoni M., Bakker E., Eurlings M., (1999), "Laboratory guidelines for the molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions", *International Journal of Andrology*, 22 292-299;

6. Krausz C., Forti G., McElreavey K.: "The Y chromosome and male fertility and infertility", *International Journal of Andrology*, 26:70-75 (2003);
7. Skaletski H., Kuroda-Kawaguchi T., Minx PJ, (2003), "The male-specific region of the Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes"; *Nature*, 423 825-837;
8. Vogt E., et al., (2004), Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis", *Reproductive BioMedicine Online*, 10 1 81-93;
9. Blanco P., Shlumucova M., Sargent C., (2002), "Divergent outcome of intrachromosomal recombination on the Y chromosome: Male infertility and recurrent polymorphism", *Journal of Medical Genetics*, 37 752-758;
10. Repping S., Skaletski H., Brown L., (2002); "Recombination between palindromes P5 and P1 on human Y chromosome causes massive deletion and spermatogenic failure", *American Journal of Human Genetics*, 71 906-922;
11. Kuroda-Kawaguchi, Skaletski H., Brown L. et al. (2001), "The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men". *Nat Genet* 29:279-286;
12. Choi JM, Chung P., Veeck L. et al., 2004, " AZF microdeletions of the Y chromosome and in vitro fertilization outcome", *Fertility and Sterility*, 81, 337-341;
13. Vogt P. et al., 2004, "Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis" *RBM Online* 10, 81-90;
14. Савов А., 2006, по данни от НГЛ, СБАЛИАГ "М. дом" ЕАД;
15. Michelmann H.W., Rath D., Klocke S., (2001); "Intracytoplasmic sperm injection in humans and farm animals", *COOK*;
16. Silber S. J., Alagappan R., Brown L. G., Page D.C. (1998) "Y chromosome deletions in azoospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction"; *Hum. Reproduction*, 13, 3332-3337.
17. Oates RD, Silber S, Brown LG et al., (2002), "Clinical characterization of 42 oligospermic or azoospermic men with microdeletion of the AZFc region on the Y chromosome, and of 18 children conceived with ICSI", *Human Reproduction*, 17, 2813-2824;
18. Simoni M., Bakker E., Eurlings M., Matthijs G., Moro E., Muller R., Vogt P., 2004, "EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. State of ART 2004", *International Journal of Andrology*, 27: 240-249;
19. Krausz C., Quintana-Murci L., McElreavey K., (2000), "Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis?", *Human Reproduction* 15, 1431-1434;
20. Krausz C., McElreavey K., (1999), "Y chromosome and male infertility", *Front Bioscience* 15., 1-8;
21. van Golde R.J. et al., (2001), "Decreased fertilization rate and embryo quality after ICSI in oligospermic men with microdeletions in azoospermia factor c region of the Y chromosome", *Human Reproduction* 16, 289-292;
22. Siffroi J.P. et al., (2000), "Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions", *Human Reproduction* 15, 2559-2562;
23. Pastalis P.C., Sismani C., Quintana-Murci L. et al., (2002), "Effects of transmission of Y chromosome AZFc deletions", *Lancet* 360, 1222-1224;
24. Page D.C., Silber S., Brown L. G., (1999); "Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons with intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility", *HumReprod*, 14, 1722-1726

Адрес за кореспонденция:

гл. ас. Алексей Савов, д.б.

Национална Генетична Лаборатория

СБАЛИАГ "Майчин Дом" ЕАД

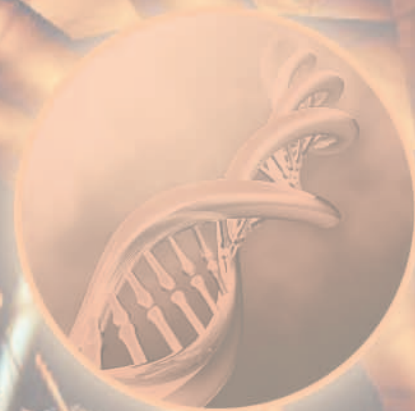
ул. "Здраве" 2, София

E-mail: asavov@medfac.acad.bg



# ЕМБРИОЛОГИЯ

Embryology



**Този брой се издава и с любезното  
съдействие на фирма Biolab.**

**Ул. Университетска N13, ап. 2  
кв. Лозенец  
София, 1164**

**Тел: 02 / 865 84 95  
Факс: 02 / 963 05 32  
E-mail: [biolab@gbg.bg](mailto:biolab@gbg.bg)**

**ISSN 1312-7349**



# MediCult IVM®

– the new treatment without hormone injections.



Life's beginning in safe hands

IVM® is a major breakthrough in Assisted Reproduction Technology making it possible to eliminate or minimise hormone injection treatment of the woman.

Furthermore, IVM® cuts the treatment time considerably to two weeks and reduces the disruption of daily life.

IVM® adds in many ways to the quality of life of women undergoing infertility treatment. MediCult has therefore not only launched the world's first commercially available IVM® System; we were also the originators of the First International Symposium on *In Vitro* Maturation of Oocytes.

The MediCult IVM® System is a result of our innovative focus within Assisted Reproduction Technology. We call it Fresh Thinking. Fresh Thinking is also a symbol of our wish to share our knowledge and experience with clinics -to ensure life's beginning in safe hands.

We therefore offer you a free CD presentation from the First International Symposium on *In Vitro* Maturation of Oocytes. Visit [www.medicult.com](http://www.medicult.com) and get a sample of Fresh Thinking from some of the world's experts.

Официален дистрибутор на MediCult, Danmark

МЕДИС ЕООД

Бул. "Джеймс Баучер" 17

София, 1164

Тел. 02 / 961 51 91

GSM 0887 787 554

e-mail: [medis@mbox.contact.bg](mailto:medis@mbox.contact.bg)

The MediCult IVM® System is 510(k) cleared by the FDA.

IVM® is a registered trademark of MediCult a/s.

 **MediCult**  
Innovation with Care

# ХРОМОЗОМНИТЕ ГРЕШКИ ПРИ ОВОЦИТИ И ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННИ ЕМБРИОНИ - ЕСТЕСТВЕНА ПРИЧИНА ЗА НИСКАТА ПЛОДОВИТОСТ ПРИ ЧОВЕКА

С. Делимитрева, Р. Живкова, М. Маркова, И. Ватев  
Катедра Биология, Медицински университет, София

## CHROMOSOMAL ERRORS IN OOCYTES AND PREIMPLANTATION EMBRYOS - A NATURAL CAUSE FOR LOW HUMAN FERTILITY

S. Delimitreva, R. Zhivkova, M. Markova, I. Vatev  
Department of Biology, Medical University of Sofia

**Резюме:** Въпреки усилията за оптимизиране на условията за култивиране на гамети и ембриони, успеваемостта на техниките за асистирана човешка репродукция е ограничено. Това ни води към идеята, че намаленият потенциал на ембрионите не би могъл да бъде резултат само от субоптимални условия *in vitro*, а принос имат и някои особености на овогенезата и ранната ембриогенеза. Този обзор представя бройните хромозомни дефекти при овоцити и предимплантационни ембриони като естествена причина за ниската плодовитост при човека.

**Abstract:** Despite the efforts to improve the conditions of gamete and embryo culture, the success rate of assisted reproductive techniques in humans is limited. This suggests that the reduced embryo potential could not be a result only of suboptimal *in vitro* conditions, but real features of oogenesis and early embryogenesis are involved. Our review presents numerical chromosome errors as a natural cause for low human fertility.

### Исследване на предимплантационната ембриогенеза

Началото на изучаването на ранната ембриогенеза на бозайниците е поставено от Карл Хартман, който за първи път през 1931 година публикува наблюденията си върху естествено овулирани говежди овоцити и предимплантационни ембриони, добити чрез промиване на яйцепроводи. По-късно подобен подход е приложен за добиване на яйцеклетки и ранни ембриони и от други видове с лесно прогнозируеми или предизвиквани еструси с многобройни овулации - зайци, гризачи (мишки, хамстери, плъхове), копитни домашни животни (кози, овце, свине, коне) <sup>(1-5)</sup>. Първоначалното впечатление, че предимплантационната ембриогенеза следва един и същ модел при всички изследвани бозайници, скоро е заменено от разбирането, че различията са съществени.

Филогенезата на бозайниците се разклонява твърде рано след обособяването им като таксономичен клас, което намира илюстрация и в дивергенцията на репродуктивните им механизми. Дори в толкова кратък период като този от оплождането до имплантацията на зародиша, онтогенезата при различните разреди, както и в рамките на един и същи разред, се

различава в ключови детайли. Те се оказват твърде важни от научна и медицинска гледна точка. Затова изследването на човешкото предимплантационно развитие изисква използването на човешки овоцити и ембриони или максимално близките еволюционно приматни модели. Засега са разработени системи за *in vitro* манипулиране и култивиране на гамети и предимплантационни ембриони за резус-макак (*Macaca mulatta*) <sup>(6)</sup> и обикновена мармозета (*Callithrix jacchus*). Ограничението при резусите идва от това, че са твърде едри и отглеждането им, яйчниковата стимулация и получаването на предимплантационни ембриони от тях е скъпо. При мармозетите предимството е, че са дребни, лесно се отглеждат и размножават в плен и са единственото семейство примати, при което се наблюдава множествена овулация (3-5 овоцита за един цикъл). Единствен източник на материал за пряко изследване на оплождането и най-ранното развитие на собствения ни вид са неоплодените овоцити и "излишните" ембриони, получени при *in vitro* оплождане.

Едно възможно решение на проблема за достъпността на човешките предимплантационни ембриони е разработваната в последно



време техника за *in vitro* зреене на овоцити (*in vitro maturation, IVM*)<sup>(7)</sup>. Накратко, тя представлява микрохирургична дисекция на голям брой преантрални и незрели малки антрални фоликули от яйчникова тъкан и култивиране в присъствие на хормони до узряването им. През това време овоцитите в тях преминават от състояние на мейотична профаза I до метафаза II, отделят първото си полярно телце и стават годни за оплождане. Прилагането на IVM за човешка яйчникова тъкан, получена при хирургични манипулации или дори и аутопсии, ще даде възможност за получаване на многобройни зрели овоцити, които да се инсеминират със сперматозоиди от анонимни дарители. Смята се, че получените по този начин "ничи" човешки предимплантационни ембриони ще бъдат основа на бъдещите изследвания, касаещи най-ранните етапи от човешката ембриогенеза, лечението на безплодието, терапевтичното клониране и получаване на ембрионални стволови клетки.

#### **Успеваемостта на размножаването на бозайниците е ограничена**

Оплождането *in vitro* се развива като подход за лечение на човешкото безплодие. Доста скоро след въвеждането му се забелязва известно разочарование от факта, че успеваемостта на метода е ограничена. Първоначално се е смятало, че това в най-голяма степен се дължи на субоптималните условия на *in vitro* средата, хормоналното стимулиране, техниките на овоцитна аспирация и несъвършенствата на системите и средите за култивиране на гамети и зародиши. Логично, усилията за постигане на по-високо ниво на успех се насочват към оптимизиране на тези фактори<sup>(8-15)</sup>. Още един тласък на развитието на асистираното оплождане дават микроманипулационните техники за преодоляване на някои причините за мъжко безплодие - субзонално и интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоиди (SUZI, ICSI)<sup>(16)</sup>. Напоследък успеваемостта на асистираните репродуктивни технологии се доближава до тази на естественото зачеване. Това обаче до голяма степен се дължи на трансфериране на повече от един ембрион в матката - най-често два или три. Приема се, че шансът на всеки отделен *in vitro* получен ембрион да се имплантира в ендометриума е около 15%<sup>(17)</sup>. Тези факти означават, че възможностите за подобряване на методите за изкуствено оплождане не са изчерпани, но все пак са ограничени.

Сега вече се знае, че ниската успеваемост на имплантацията е характерна за всички изследвани бозайници, независимо дали става въпрос за изкуствено или естествено зачеване.

Следователно лимитиращият фактор за успеха на IVF трябва да е естествена характеристика за самите ембриони.

#### **Морфологични проблеми на предимплантационните ембриони**

Най-очевидният проблем на човешките предимплантационни ембриони е високото ниво на морфологични отклонения - в повече от половината ембриони се забелязват клетъчни фрагменти, голяма разлика в размера на бластомерите, безядрени бластомери и такива с повече от едно ядро, апоптоични и некротични клетки, неадекватна честота или спиране на митозите<sup>(18,19)</sup>. Тези наблюдения, съпоставени с факта, че по-малко от половината *in vitro* получени ембриони успяват да образуват нормални бластоцисти, водят до заключението, че морфологичните дефекти на ембрионите ограничават успеха на IVF. Данните за влиянието на различните морфологични отклонения върху потенциала на ембрионите да достигнат бластоцистен стадий са обобщени в таблица 1:

Таблица 1

Вид на морфологичното отклонение	Ембриони, формирали бластоцисти
Клетъчна фрагментация до 15%	33 %
Клетъчна фрагментация над 15%	17 %
По-голям брой клетки от нормалното	28 %
По-малък брой клетки от нормалното	14 %
Отклонения в броя и формата на ядрата	15 %
Без морфологични отклонения	45 - 55 %

#### **Цитогенетични дефекти на човешките овоцити**

За първи път цитогенетично изследване на човешки овоцити е публикувано от Edwards през 1968 година<sup>(20)</sup>, а на човешки предимплантационни ембриони - 1983 година<sup>(21)</sup>. Метафазното състояние на овулираните овоцити на бозайниците се поддържа до проникване на сперматозоид в тях. Този факт улеснява кариотипирането на неоплодени овоцити, защото предварително третиране с цитостатици не е необходимо. Данните, натрупани от трийсетте години на миналия век насам, показват че бройните хромозомни аномалии се срещат в голяма част от яйцеклетките, получени след хормонална стимулация или естествено овулирани. Данните за нивото на анеуплоидия при неоплодени след IVF човешки овоцити, публикувани от различни колективи и в различни периоди, са доста противоречиви. Ако се изключат граничните стойности, цифрите варират между 25-35%<sup>(20, 22-24)</sup>. Доста оскъдни, но

подобни са данните за човешки яйцеклетки, получени без хормонална стимулация <sup>(25)</sup>. При овоцити на резуси и мармозети честотата на анеуплоидия е подобна <sup>(6, 26)</sup>. Затова се приема, че хромозомните грешки не са артефакт на екзогенната свръхстимулация на човешките яйчници, а са резултат от естествена неперфектност на мейозата. Първоначално предполагащата връзка между намалената успеваемост на оплождането с хромозомни грешки в овоцита не е доказана <sup>(27)</sup>. Съпоставяйки тези данни с факта, че повече от половината спонтанни аборти се дължат на анеуплоидии, се стига до идеята, че различният потенциал за развитие на предимплантационните ембриони е свързан с хромозомни грешки, наследени най-често от овоцита.

### *Склонност за хромозомни грешки при първите ембрионални митози*

Въпреки клиничното значение на анеуплоидиите при човека, за молекулните механизми на възникването им се знае малко. Има сериозни доводи, но не и реални доказателства, че хромозомните грешки при овоцити (следователно и ембриони) се дължат на промени на хиазмите между несестринските хроматиди и/или проблеми при кохезията на сестринските хроматиди, които водят до преждевременно разделяне на бивалентите при мейозата и поява на единични хроматиди в зрелите овоцити. При дрожди, растения и насекоми са известни мутанти, които при определени условия имат повишена честота на грешките на хромозомната сегрегация. При бозайниците обаче, въпреки че са известни редица мутации, разстройващи синапса на хромозомите, рекомбинацията и други компоненти на мейотичните и митотични механизми <sup>(28)</sup>, не е известно как точно се постига фенотип, водещ до грешки в сегрегацията.

При изследване на ранни ембриони на бозайници е установено, че грешки при разпрелянето са равно вероятни за всички хромозоми. Едно изключение е Y-хромозомата при хибридни ембриони от миши линии BALBC/cVm, означаваща като Wt-Y хромозома. Wt-Y хромозомата е склонна към неотделяне в митотични (но не и в мейотични) цикли <sup>(29, 30)</sup>. При ембрионите, носещи Wt-Y, е регистрирано изключително високо ниво на неотделяне - до 50% от ембрионите на стадий 16 клетки са мозайки по Y. Изследването показва, че неправилно разпределение на Y се допуска единствено в първите два митотични цикъла <sup>(29)</sup>. Честотата на грешките при сегрегацията на Wt-Y варира при кръстосване на Wt-мъжки с различни

линии женски мишки. Следователно нивото на неотделяне би могло да се дължи на хомозиготни състояния на определени генетични дефекти. Тези резултати водят до хипотезата, че принос за високото ниво на анеуплоидия при човешки ембриони има фактът, че първите митози на зиготата допускат грешки в хромозомната сегрегация.

Косвено доказателство, че и при човек съществуват генетични състояния, водещи до повишена склонност към грешки на хромозомната сегрегация, е фактът, че синдромът на Даун в някои популации е до четири пъти по-често срещан при близкородствени бракове <sup>(28)</sup>. Допълнителни аргументи към идеята, че склонността към грешки при първите митози е генетично предопределена, дават хромозомните изследвания на предимплантационните ембриони на отделни семейства:

- Около 5% от човешките ембриони до стадий уплътняване на морулата имат "хаотично" разпределение на хромозомите (като "хаотични" се означават ембрионите, при които много хромозоми имат абнормален брой и засегнатите хромозоми са различни за всяка клетка). При отделни семейства е забелязана много голяма вероятност за получаване на ембриони с такива екстремни дефекти на хромозомното разпределение <sup>(17)</sup>.
- Колкото е по-голям броят на неуспешните IVF процедури при дадено семейство, толкова е по-високо нивото на анеуплоидия при изследваните предимплантационни ембриони <sup>(31)</sup>.
- Процентът на анеуплоидни ембриони, получени от дадено семейство при отделните му IVF процедури, е приблизително еднакъв <sup>(32)</sup>. Следователно процентът анеуплоидни ембриони от един IVF цикъл може да служи като прогностичен критерий за успеха на следващи IVF процедури на същото семейство.
- Има и данни, че при мишки нивото на грешки на сегрегацията при Wt-Y-хромозомата се влияе и от условията на култивиране <sup>(29)</sup>. Но *in vitro* условията не могат да бъдат нито единствена, нито главна причина за хромозомното неотделяне при зародишите - при други миши линии не е забелязано повишаване на нивото на анеуплоидии при *in vitro* култивирани ембриони. Макар засега да не е ясно доколко *in vitro* условията влияят на митотичните грешки, такава евентуална



връзка трябва да се взема предвид при внедряване на нови системи и хранителни среди за култивиране на човешки зародиши.

### **Ниво на анеуплоидия при човешките предимплантационни ембриони**

При човешките *in vitro* получени ембриони са регистрирани анеуплоидии, мозайки от диплоидни и анеуплоидни клетки, полиплоидия и хаплоидия <sup>(18, 19, 33, 35)</sup>. Установено е, че нивото на хромозомни отклонения е около три пъти по-високо при ембриони с морфологични дефекти - 12% срещу 37% <sup>(20)</sup>. До края на осемдесетте години процентът на анеуплоидните предимплантационни ембриони варира в широки граници при различните автори. Това може да се обясни с малкия брой изследвани зародиши, както и с ниската ефективност на класическото кариотипиране на ранни ембриони. Средният процент на ембриони с хромозомни нарушения, цитиран дотогава, е 23% <sup>(20, 35)</sup>. Забелязано е, че хромозомните нарушения са по-чести при човешките зародиши, отколкото при други бозайници. При мишки данните за хромозомно абнормални зародиши варират от 3 до 21%, а при изследваните домашни животни - от 7 до 10%.

След въвеждане на FISH-техниката (флуоресцентна *in situ* хибридизация) изследванията на хромозомния набор на отделните бластомери се разширяват. В публикациите от средата на деветдесетте години досега данните за хромозомни нарушения при човешки предимплантационни зародиши варират от 15% до над 85%. Голямата разлика в процента се дължи на различните групи ембриони, включени в изследванията - ембриони със и без морфологични дефекти, делеящи се и такива със спрели митози, ембриони от различни групи пациенти <sup>(17, 36, 37)</sup>. Данните могат да се обобщят така:

- процентът на хромозомно нормалните ембриони е неочаквано нисък;
- голяма част от хромозомно абнормалните ембриони са мозайки;
- има връзка между грешките в хромозомния набор и различния потенциал на ембрионите през предимплантационния период, но тя не е абсолютна - ембриони с тежки хромозомни нарушения са способни да образуват морфологично нормални бластоцисти <sup>(17)</sup>.

Адаптирането на сравнителната геномна хибридизация (CGH - *Comparative Genomic Hybridization*) за прилагане върху единични клетки дава възможност да се изследва целия хромозомен набор на бластомерите. Чрез такива изследвания е установено, че 3/4 от човешките ембриони съдържат поне един бластомер с абнормален хромозомен набор <sup>(38)</sup>. Засега за нивото на хромозомни грешки при *in vitro* получени човешки зародиши на етап преди уплътняване на морулата се приема: около 25% от ембрионите показват нормален хромозомен набор, от 7 до 20% са анеуплоидни, 6% са полиплоидни, 0.6% са хаплоидни, 40-50% са мозайки, а поне 5% са хаотични. Тези проценти все още се смятат за приблизителни, защото голяма част от данните са получени при изследване на 4 - 9 хромозоми и само на една или две ембрионални клетки.

Повечето хромозомно абнормални ембриони са мозайки от диплоидни и анеуплоидни и/или полиплоидни бластомери <sup>(36, 37)</sup>. Честотите на различните типове мозайки са следните:

- 16 % -  $2n$  / хаотични хромозомни конфигурации;
- 15 % -  $2n$  /  $4n$  (по-рядко друг вид полиплоидия);
- 14 % -  $2n$  / анеуплоидни по една или повече хромозоми;
- 3 % -  $2n$  /  $n$

Има данни, че при жени под 35 годишна възраст ембрионите-мозайки са повече от тези с еднородната анеуплоидия <sup>(31)</sup>. Предполага се, че при млади жени ембрионалните хромозомни грешки възникват по-скоро в резултат на постзиготни митотични грешки, а при по-възрастни жени по-голям принос имат мейотичните грешки.

Потенциалът за развитие на мозаичните ембриони засега е малко изследван. Известните данни могат да се обобщят така: има доказателства, че мозаичните ембриони с хаотични хромозомни комбинации загиват още през предимплантационния период <sup>(39)</sup>; в 80% от хаотичните морули деленето е спряло, а при останалите делът на абнормалните клетки е малък; при спонтанни анеуплоидни аборти <sup>(40)</sup> мозаицизмът е около 5%, а при биопсирани хорионни вѐси - 1-2% <sup>(41)</sup>, следователно повечето мозайки се отстраняват в първия триместър на бременността. Обобщените данни за нивото на бройни хромозомни дефекти през предимплантационния период са представени в таблица 2.

Таблица 2

	Преди компактизация	При бластоцисти (нормална морфология)
Нормален каротип	25 % *	15 %
Анеуплоидни	7 - 25 %	38 %
Полиплоидни	6 %	7 %
Хаплоидни	< 1 %	2 %
Мозайки	40 - 50 %	Всички отчетени - до 90%, при отчитане на нормалния дял 2n/4n - 38%
Хаотични	4 - 9 %	Не са регистрирани

\* според резултати от CGH

Представените данни са получени от сравнително малки групи ембриони, но са достатъчно красноречиви, за да засилят интереса към изследване на причините за тази ситуация, естествения отбор на ембрионите и връзката на предимплантационните хромозомни аномалии с ниската плодовитост на човека и приматите въобще. Съществува хипотеза, че бройните хромозомни аномалии при ранни ембриони се дължат на неефективност на механизмите за контрол на клетъчния цикъл при женската мейоза и първите ембрионални митози. В последните години тази хипотеза се подкрепя от все повече доказателства.

#### **Контрол на клетъчния цикъл при мейозата и първите ембрионални митози**

Механизмът за контрол на клетъчния цикъл при еукариотните клетки позволява навлизането в митоза и довършването ѝ само при клетки, които отговарят на определени критерии. Останалите или не биват допускани до делене, или то се забавя до коригирането на нарушенията, или, ако грешките не могат да се поправят за допустимото време, клетките се насочват към апоптоза. Механизмите на контрола на клетъчния цикъл са универсални и еволюционно консервативни. Но странностите на репродукцията на бозайниците се проявяват и тук - не само че ефективността на контрола е непълна, но освен това е различна за двата пола.

Бройни хромозомни грешки се наблюдават в 10-25% от човешките фетуси. До 80% от тях се дължат на грешки в прехода метафаза I - анафаза I при овогенезата <sup>(42)</sup>. Те са резултат на изплъзнали се от контрол неразделени или предварително разделени биваленти или сестрински хроматиди. Доказано е, че ефективността на контрола на женската мейоза е намалена както при екзогенно хормонално стимулиране, така и при спонтанна

овулация. Опитните данни за мишата овогенеза показват, че намаляването на ефективността на контрола при прехода метафаза I - анафаза I може да се повлиява както от генни взаимодействия (зависи от кръстосването на линии), така и от промяна на условията на зреене на овоцитите. Резултатите от тези изследвания водят до извода, че дори малки промени във факторите, въввлечени във фоликулогенезата, могат да променят честотата на мейотичните грешки. Това е едно от вероятните обяснения за по-голямата честота на анеуплоидии при овоцити на възрастни жени. Проблемът е труден за изследване, защото повишаване на нивото на мейотични грешки с възрастта засега е забелязано само при човека <sup>(42)</sup>. При първите опити за изследване на *in vitro* зрели овоцити на примати е установено, че регистрираните бройни хромозомни отклонения и дефекти на мейотичното вретено са свързани с проблеми на овогенезата и различното качество на фоликулите, от които са добити овоцитите <sup>(26)</sup>. Това е сериозен довод в подкрепа на необходимостта от детайлно изследване на мейозата и проблемите на фоликулогенезата върху приматни модели.

Предполага се, че нормален контрол на клетъчния цикъл се въвежда по време на прехода морула-бластоцист. По това време ембрионалният геном вече е активиран. Връзката между двата факта все още не е напълно изяснена.

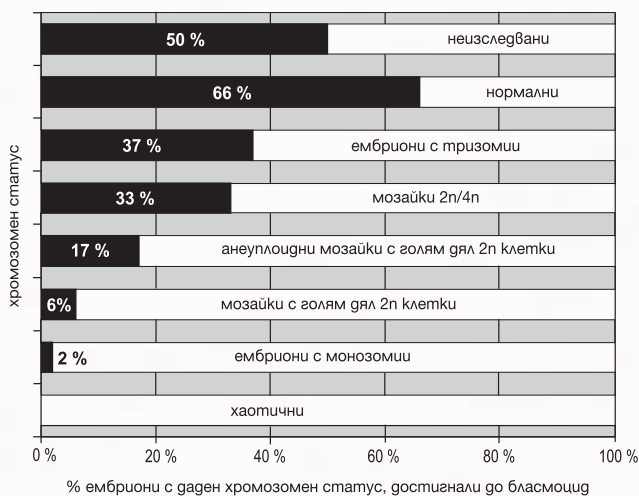
#### **Естествена селекция на ембриони с нормален хромозомен набор**

Един от подходите за повишаване на процента на имплантация след IVF е практикуването в някои IVF-центрове трансфер на бластоцисти. Един от доводите в полза на този подход е предположението, че до достигане на бластоцистен стадий се елиминират част от



хромозомно абнормалните ембриони. Сега е доказано, че ако съществуват механизми за естествена селекция на перспективни ембриони до достигане на стадий ранен бластоцист, те не се основават единствено на нормалността на кариотипа. Еднородни тризомии и някои монозомии са съвместими с формирането на бластоцисти - 20% от човешките ембриони, които са с доказан абнормален кариотип на третия ден след оплождането, достигат до бластоцистен стадий <sup>(43)</sup>. Около 1/3 от човешките бластоцисти са анеуплоидни, повече от 80% от тях носят тризомии, а останалите - монозомии по хромозоми X и 21. Засега в морфологично нормални бластоцисти не са регистрирани монозомии по други хромозоми. Сред бластоцистите не са доказани хаотични хромозомни конфигурации, както и мозайки с над 60% абнормални клетки. Изследванията на потенциала на ембриони с доказано абнормален кариотип за достигане до бластоцист са обобщени във фигура 1. Може да се направи извод, че зависимостта между морфологичните характеристики и напредването на ембриогенезата до бластоцистен стадий от една страна и хромозомните отклонения от друга, не е абсолютна и затова подбирането на ембриони с отлична морфология или напреднали до бластоцистен стадий увеличава вероятността, но не гарантира трансфер на ембриони с нормален кариотип.

Фигура 1



#### Хипотеза за големия цитоплазмен обем

Правилното протичане на хромозомното разделяне при мейозата и първите ембрионални митози има ключово значение за онтогенезата. Имайки предвид това, сравнително голямата вероятност за възникване на бройни хромозомни дефекти в тези моменти от репродукцията на бозайниците е доста изненадваща. Единственото

засега приемливо обяснение на този факт е, че контролът на хромозомното разпределение е затруднен от големия обем на яйцеклетката и първите ембрионални клетки. Тази хипотеза се подкрепя от ембриологични изследвания при понижши гръбначни. Експерименти с овоцитни екстракти от *Xenopus* показват, че промяната на активността на контролните механизми между метафаза и анафаза при третиране с инхибитори на микротубулната полимеризация зависи от отношението между обемите на цитоплазмената и хроматиновата фракция <sup>(44)</sup>. Хипотезата намира потвърждение и при още по-отдалечен ембриологичен модел. За първите митози на ембрионите на *Echinodermata* (морски таралеж) е доказано, че също са склонни към нарушения на контрола - докато обемът на бластомерите е все още голям, грешките в хромозомното подреждане не водят до забавяне на прехода метафаза-анафаза <sup>(45)</sup>. Хипотезата, че своеобразните прояви на първите ембрионални митози произтичат от големия цитоплазмен обем, би могла да се отнесе и към други феномени при ранните ембриони, каквито са ядрената и цитоплазмена деструкция, между които връзките са неясни и вероятно не са задължителни <sup>(18)</sup>.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Vatev I, Some basic methods in the experimental embryology of mammals. *Biol Immunol Rprod*. 1986; 12: 83-88.
- Vatev I. In vitro fertilization and manipulation with mouse ova. *Proceedings of III International Symposium of Reproductive Immunology*. Magdeburg, Germany, 1996.
- Vatev I, Zivkov S. Fertilization in vitro of eggs from chinese hamster (*Cricetulus griseus*). *Compt Rend Bulg Acad Sci*. 1980; 33: 289-291.
- Vatev I, Zivkov S. Capacitation of mouse spermatozoa in vitro. *Compt Rend Bulg Acad Sci*. 1980a; 33: 1115-1118.
- Vatev I, Zivkov S. In vitro activation of mouse oocytes. *Methodological Problems*. 1982; 10: 147-152.
- Schramm RD, Paprocki AM, Bavister BD. Features associated with reproductive ageing in female rhesus monkeys. *Hum Reprod*. 2002 Jun;17 (6):1597-603.
- Nayudu PL, Wu J, Michelmann HW. In vitro development of marmoset monkey oocytes by pre-antral follicle culture. *Reprod Domest Anim*. 2003 Apr;38(2):90-6.
- Ватев И. "Ин витро" оплождане на човешки овоцити. *Акушерство и гинекология (София)*. 1978;1: 68-73.
- Ватев И. Дисертационен труд "Биологични и имунологични изследвания на оплождането "ин витро" при бозайници". Катедра Биология, Медицинска академия, София, 1985.
- Vatev I, High Fertilization rate in human in vitro fertilization procedures upon using a chemically defined medium. *Compt Rend Bulg Acad Sci*. 1987; 40: 101-104.
- Vatev IT. Human in vitro fertilization and embryo transfer program at the Medical Academy, Sofia, Bulgaria. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1988 Feb; 5(1):48-9.
- Vatev I. Development of IVF technology in Bulgaria. *ARTA*. 1992; 3: 135-136.
- Vatev I. Medically-assisted procreation and the protection of the human embryo. *Third Symposium on Bioethics*. Strasbourg, France, 1996a

14. Vassilev B, Vatev I. Le prelevement d'ocytes humains et les resultants de leur exploration. Proceedings of Fifth International Symposium of Reproductive Immunology, 1982, Sofia, Bulgaria.
15. Vatev I, Fitchev P, Tabakova P, Dimitrov M, Yanakieva T, Yordanov V, Vakrilov G. The in vitro fertilization and embryo transfer program at the First Women's Hospital "T. Kirkova," Sofia, Bulgaria. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1990 Apr; 7(2):119.
16. Vatev I, Karagoyzov I, Istatkov M, Srebrevna M. Successful application of the fallopian sperm perfusion method and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) technique for treatment of human infertility. *Balkan J Med Genet* 1998; 3: 115-119.
17. Delhanty JD. Preimplantation genetics: an explanation for poor human fertility? *Ann Hum Genet.* 2001 Jul;65(Pt 4):331-8.
18. Delimitreva SM, Zhivkova RS, Vatev IT, Toncheva DI Chromosomal disorders, nuclear and cell destruction in cleaving human embryos. *Int J Dev Biol* (2005) 49, 409-16.
19. Делимитрева С. Дисертационен труд "Клетъчна и ядрена деструкция и хромозомни дефекти при предимплантационни човешки ембриони" Катедра Биология, Медицинска университет, София, 2005.
20. Plachot M, de Grouchy J, Junca AM, Mandelbaum J, Turleau C, Couillin P, Cohen J, Salat-Baroux J. From oocyte to embryo: a model, deduced from in vitro fertilization, for natural selection against chromosome abnormalities. *Ann Genet.* 1987;30(1):22-32.
21. Angell RR, Aitken RJ, van Look PF, Lumsden MA, Templeton AA. Chromosome abnormalities in human embryos after in vitro fertilization. *Nature.* 1983 May 26;303(5915):336-8.
22. Fitchev Ph, Toncheva D, Vatev I. A cytogenetic study of unfertilized human oocytes. *Comp Rend Acad Bulg Sci.* 1991; 44: 69-72.
23. Zhivkova RS. Ploidity and chromatin status of human oocytes after failed in vitro fertilization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003 Aug 15;109(2):185-9.
24. Zhivkova RS, S. Delimitreva, D. Toncheva, I. Vatev Analysis of human unfertilized oocytes and pronuclear zygotes - correlation between chromosome / chromatin status and patient-related factors. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (2006) In press.
25. Volarcik K, Sheean L, Goldfarb J, Woods L, Abdul-Karim FW, Hunt P. The meiotic competence of in-vitro matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. *Hum Reprod.* 1998 Jan;13(1):154-60.
26. 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, 240-7.
27. Benkhalifa M, Kahraman S, Caserta D, Domez E, Qumsiyeh MB. Morphological and cytogenetic analysis of intact oocytes and blocked zygotes. *Prenat Diagn.* 2003 May;23(5):397-404.
28. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)<sup>TM</sup>. National Center for Biotechnology Information Web site. John Hopkins University; McKusick VA, ed. 257300: *Nondisjunction*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim>.
29. Bean CJ, Hassold TJ, Judis L, Hunt PA. Fertilization in vitro increases non-disjunction during early cleavage divisions in a mouse model system. *Hum Reprod.* 2002 Sep;17(9):2362-7.
30. Whitten WK, Carter SC, Beamer WG. Sex reversing non-disjunction of the Y chromosome produces exceptionally low sex ratio (% males) and hermaphrodites in the progeny of male BALB/cBm mice: the roles of the maternal genotype and the Y chromosome. *Reprod Fert Dev.* 1991;3(3):255-65.
31. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munne S. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril.* 1999 Nov;72(5):837-44.
32. Ferraretti AP, Magli MC, Kopcow L, Gianaroli L. Prognostic role of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in assisted reproductive technology outcome. *Hum Reprod.* 2004 Mar;19(3):694-9
33. Delimitreva S. The status of the chromatin of human preimplantation embryos with good morphology. *Folia Biologica* (2002) 48,149-153
34. Delimitreva S, R. Zhivkova, I. Vatev: Supernumerary human preembryos provide potential for preimplantation genetic diagnosis. *Folia Biologica (Praha)*,47, 2001, 88-81.
35. Michelmann HW, Bonhoff A, Mettler L. In vitro fertilization and embryo transfer. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 1986 Mar;10(3):111-5.
36. Bielanska M, Tan SL, Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod.* 2002 Feb;17(2):413-9.
37. Munne S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L, Tucker M, Marquez C, Sable D, Ferraretti AP, Massey JB, Scott R. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod.* 1999 Sep;14(9):2191-9.
38. Wells D, Delhanty JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod.* 2000 Nov;6(11):1055-62.
39. Almeida PA, Bolton VN. The relationship between chromosomal abnormality in the human preimplantation embryo and development in vitro. *Reprod Fert Dev.* 1996;8(2):235-41.
40. Hassold T. Mosaic trisomies in human spontaneous abortions. *Hum Genet.* 1982;61(1):31-5.
41. Ledbetter DH, Zachary JM, Simpson JL, Golbus MS, Pergament E, Jackson L, Mahoney MJ, Desnick RJ, Schulman J, Copeland KL, et al. Cytogenetic results from the U.S. Collaborative Study on CVS. *Prenat Diagn.* 1992 May;12 (5): 317-45.
42. Hunt PA, Hassold TJ. Sex matters in meiosis. *Science.* 2002 Jun 21;296 (5576):2181-3.
43. Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munne S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod.* 2001 Sep;16(9):1954-8.
44. Minshull J, Sun H, Tonks NK, Murray AW. A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Cell.* 1994 Nov 4;79(3):475-86.
45. Sluder G, Miller FJ, Thompson EA, Wolf DE. Feedback control of the metaphase-anaphase transition in sea urchin zygotes: role of maloriented chromosomes. *J Cell Biol.* 1994Jul;126(1): 189-98.

Адрес за кореспонденция:  
 Стефка Делимитрева, дб  
 гл. асистент в катедра Биология,  
 Лаборатория по in vitro оплождане и предимплантационна ембриология,  
 Медицински университет, София  
 Тел. 9172 680, 9172 687  
 delimitr@medfac.acad.bg



# ПОЛУЧАВАНЕ, КУЛТИВИРАНЕ И ИЗПОЛЗВАНЕ НА ЧОВЕШКИ ЕМБРИОНАЛНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

П. Тодоров

Институт по биология и имунология на размножаването - БАН

## DERIVATION, CULTURE AND APPLICATION OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS

P. Todorov

Institute of Biology and Immunology of Reproduction - BAS

**Резюме:** Човешките ембрионални стволови клетки са плурипотентни клетки, получавани от вътреклетъчната маса на бластоциста. Те експресират маркери, типични за стволовите клетки, притежават висока теломеразна активност, нормален кариотип и потенциал за диференциация в различни клетъчни типове, включително герминални. Това ги прави интересен и перспективен обект за нуждите на клетъчната терапия. В обзора е представена информация за методите за получаване, култивиране, криоконсервация и възможности за използване на човешките ембрионални стволови клетки.

**Abstract:** Human embryonic stem cells are pluripotent cells derived from the inner cell mass of blastocyst. They express typical stem cell markers, possess high levels of telomerase activity, show normal karyotype and have the potential to differentiate into numerous cell types, including germ cells. Therefore, human embryonic stem cells are potentially valuable for the development of cell transplantation therapies for the treatment of various diseases.

Човешкият организъм е изграден от около 200 вида соматични клетки, включени в различни тъкани, органи и системи. Освен тях съществуват и герминални (полови) клетки. В последните години все по-често се говори и за така наречените стволови клетки (stem cells), като темата често е обект на спекулации от страна на обществените медии. Името "стволова" произлиза от виждането за ствола на растенията, който расте нагоре, удължавайки се, докато се разклонява и разлиства встрани. В чисто научен аспект под термина стволови клетки /СК/ най-общо се подразбира популация от ранни, недиференцирани родоначалници на "възрастните" клетки. За да станат "възрастни", те са длъжни да преминат процес на диференциация. Терминално диференцираните клетки по принцип не са способни към последващи митози и количеството им в организма се поддържа за сметка на деленето на слабодиференцирани предшественици. В зависимост от способността си за диференциация (в какви видове клетки могат да се превърнат) СК биват тотипотентни, плурипотентни, мултипотентни и прогениторни. Според източника на получаване се разделят на две категории - ембрионални стволови клетки /ЕСК/, включваща стволовите клетки на предимплантационния ембрион, и регионални

(тъканноспецифични) стволови клетки. Тъканноспецифични СК са изолирани от над 20 тъкани и органи на човешки фетуси и възрастни индивиди. Те са източник на диференцирани клетки в определени компартменти на организма през целия живот, включително и на етапа на ембриогенезата. В повечето случаи могат да се диференцират само в ограничен брой клетъчни линии (такива са например хемопоетичните или мезенхимни стволови клетки, получавани от костен мозък, периферна или умбиликална кръв). Използването им като средство за заместваща клетъчна терапия вече е намерило приложение в медицината. Те помагат за регенерацията на увреденият тъкан и поддържането на хомеостазата.

### Ембрионални стволови клетки /ЕСК/

ЕСК - това са стволовите клетки на предимплантационния ембрион. Те дават началото на всички клетки и тъкани в организма. Плурипотентността на ЕСК е безспорно доказан факт за разлика от тъканноспецифичните СК на възрастния организъм. При трансплантация на животни ЕСК образуват тератоми (тумори, изградени от тъкани и на трите зародишни пласта), което е отражение на тяхната плурипотентност. ЕСК притежават значително по-голям потенциал за диференциация и

огромен пролиферативен потенциал, което ги прави перспективен обект за нуждите на клетъчната терапия. Тези клетки притежават способност към спонтанно и индуцирано насочена диференциация "in vitro" с образуване на различни типове соматични <sup>(1)</sup> и полови клетки <sup>(2)</sup>. Показано е, че при поддържане на клонирани човешки ЕСК /чЕСК/ в продължение на 8 месеца от момента на получаването им и преминаването им за този период през 286 цикъла на клетъчно деление те в пълен обем запазват потенциала си за диференциация. Клетките имат нормален кариотип, а също така експресират високи нива на теломераза <sup>(3)</sup>.

### Историческа справка

Изследванията в областта на ембрионалните стволови клетки започват през 1963 г. Първоначално се използват дезагрегирани ембриони от зайци и мишки. По-късно са отработени методики за изолиране на вътреклетъчната маса на бластоциста (inner cell mass), която учените култивират както в интактен вид, така и във вид на клетъчни дезагрегати. Първите линии ЕСК са получени през 1981 г. от миши бластоцисти чрез култивиране на вътреклетъчната маса върху фидерен слой <sup>(4)</sup>. По-късно са изолирани ЕСК от заек, плъх, свиня, крава и примати. Човешки ЕСК са получени за първи път през 1998 г. <sup>(5)</sup>. Две години по-късно Reubinoff et al. потвърждават възможността чЕСК да бъдат изолирани успешно от предимплантационни ембриони, като същевременно демонстрират потенциала на тези клетки да се диференцират в различни клетъчни типове при "in vitro" условия <sup>(6)</sup>. В последващите години и други екипи съобщават за получаването на чЕСК. Проведени са множество експерименти с цел оптимизиране условията за култивиране <sup>(7, 8)</sup>, манипулациите с генома <sup>(9)</sup> и режимите за диференциация на клетките и използването им за трансплантация и тестване на лекарства <sup>(10-12)</sup>. В момента броят на регистрираните линии е над 200, като част от тях се предлагат за продажба от различни компании (BresaGen, Inc., Cellartis AB, WiCell, ES Cell International, CyThera, Inc. и др.). Към Националния Здравен Институт на САЩ (НИИ) съществува регистър, в който са включени над 70 напълно характеризирани линии чЕСК.

### Получаване и култивиране на чЕСК

ЕСК могат да бъдат получени от вътреклетъчната маса на ембриона (бластоцист) на предимплантационен стадий. На 5-6 ден след оплождането човешкият ембрион е изграден от 50-150 клетки (съответно ранен и експандирал бластоцист). Вътреклетъчната маса на такъв ембрион съдържа 20-60 клетки. Представлява пул

от плурипотентни клетки, формиращи както самия ембрион и впоследствие възрастния организъм, така и редица екстраембрионални тъкани.

Като източник на чЕСК в практиката се използват предимплантационни ембриони, получени "in vitro". Чрез естествен "хетчинг" или ензимна обработка на 5-7 ден след оплождането бластоцистите се освобождават от *zona pellucida*. На следващия етап с помощта на имунохирургия (използване на антитела) или механични (микроманипулационни) методи се елиминират клетките на трофобласта. Изолираните вътреклетъчни маси се култивират върху предварително инактивиран фидерен слой клетки (най-често миши ембрионални фибробласти). За инактивиране на "фидерните" клетки се използва 10 мкг/мл митомизин С за 90-120 минути или гама-стерилизация (4000-8000 rads). Като недостатък на метода се отчита животинският произход на фидерният слой. Поради тази причина все повече изследователи се ориентират към използване на човешки клетки за монослой - плацентарни фибробласти, утеринни ендометриални клетки, паренхимни клетки от гърдата, фетални фибробласти (от абортен материал), мезенхимни клетки от костен мозък и др. <sup>(13,14)</sup> Предполага се, че фидерният слой секретира в средата все още неидентифицирани напълно растежни фактори (напр. LIF-leukemia inhibitory factor, bFGF-basic fibroblast growth factor), които подпомагат митотичната активност на ЕСК и задържат тяхната диференциация. Възможно е използването и на кондиционирана среда. Фидерният слой или кондиционираната среда се подготвят предварително <sup>(15)</sup>.

За разлика от мишите чЕСК не могат да бъдат култивирани поединично. Те растат във вид на обемни (куполовидни) колонии, изпъкващи над повърхността на монослоя. Колониите са с ясно очертани краища и плътни контакти между клетките. Характерно за чЕСК е високото ядрено-цитоплазмено съотношение, с 1-3 проминаращи нуклеоли.

Най-често чЕСК се култивират в петриеви панички или 6-ямкови плаки. Желателната гъстота на колониите е 200-250 колонии за 35 мм петриева паничка и 500 колонии за 60 мм. (когато се използва висока плътност на фидерния слой). При тази гъстота най-добре се запазва общият недиференциран статус на културата <sup>(16)</sup>. За култивиране на клетките се използват специални среди, в които серумът е заменен със синтетични заместители (SSR - *synthetic serum*



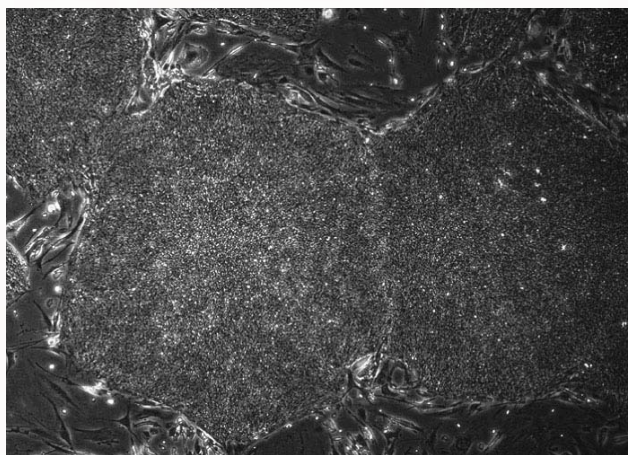
replacement). Известно е, че използването на фетален серум повишава риска от спонтанна диференциация на клетките. Важно е и допълнителното обогатяване на средата с някои субстанции (4 ng/ml basic fibroblast growth factor, 1-2 mM glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids, 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 50 IU/ml penicillin + 50  $\mu$ g/ml streptomycin и др.).

Колониите могат да са различни морфологични типове в зависимост от плътността на монослоя, върху който се култивират. При висока плътност на монослоя се наблюдават плътни, куполовидни колонии. При разрастване на колонията се формира вдлъбнатина в центъра. След 5-6 дни размерът на колонията нормално е между 0.5 - 2.0 мм в диаметър. В идеалния случай колониите покриват цялата повърхност на плаката с малки промеждутъци между тях. При по-ниска плътност на фидерния слой се наблюдават плоски, хоризонтални колонии. В този случай се използва и по-ниска посевна гъстота на колониите, тъй като те са по-широки (приблизително по 150 колонии в 35 мм петриева паничка). В клетките се наблюдават добре видими нуклеоли. И в двата типа колонии клетките експресират плурипотентни маркери и могат да образуват ембрионидни телца.

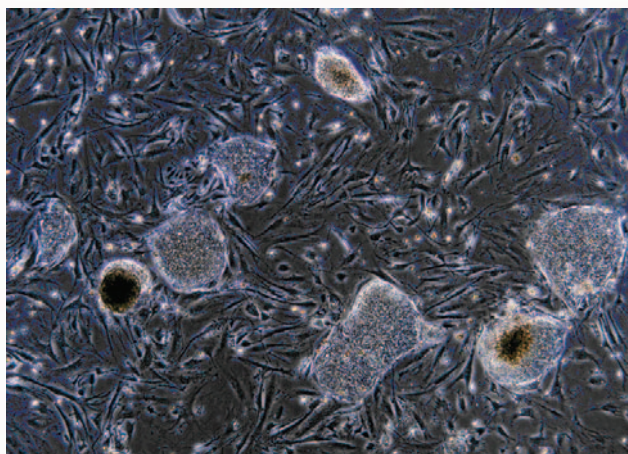
Колониите растат бързо, като стволовите клетки се делят на всеки 15-18 часа. При покриване на 80% от дъното на плаката следва да бъдат пасирани.

Пасирането на колониите се извършва по два начина:

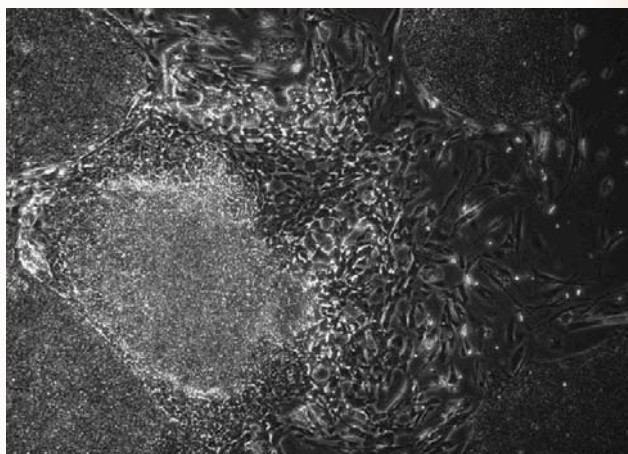
- чрез микродисекция (с помощта на стереомикроскоп). Колониите се отделят механично;
- използване на ензими (колагеназа тип IV - 1mg/ml). Целта е след откъсване на клетките от монослоя колониите да се "обелят" от обкръжаващите ги клетки. Трябва да се внимава колониите да не се дисагрегират на единични клетки. Нормално е да са на по 20-100 клетки. При всеки пасаж диференцираните колонии се отделят. Така се запазва общият недиференциран статус на културата. В колониите с частична диференциация се отделят областите с клетки, започнали да се диференцират. Критериите за спонтанна диференциация най-често са морфологични (Фиг. 1, 2 и 3)



Фиг. 1 Недиференцирани колонии чЕСК



Фиг.2 Колонии чЕСК с признаци на диференциация в центъра на колониите



Фиг.3 Колония чЕСК с признаци на диференциация по краищата (периметъра) на колонията

### Криоконсервация

Дълготрайното съхранение на чЕСК и обменът на клетъчни линии между лабораториите налага необходимостта от криоконсервация на този вид клетки. Чрез замразяване могат да бъдат запазени и някои специфични клонове, получени от оригиналните клетъчни линии или чрез генно модифициране.

Конвенционалните методи за криоконсервация на клетъчни култури под защитата на 10% диметилсулфоксид (DMSO) се характеризират със сравнително ниски скорости на охлаждане и бързо размразяване. Показано е, че освен за соматични клетки тези методи са ефективни и за замразяване на ЕСК от мишки<sup>(17)</sup>. За разлика от мишите, колонии от чЕСК трудно могат да бъдат дисагрегирани на отделни клетки, които да дадат началото на продължителна култура. Те са доста по-чувствителни към факторите на процеса на нискотемпературна консервация, отличават се със сравнително малък клетъчен обем и лесно се диференцират. При използване на рутинни режими за замразяване не повече от 20-25 % от тях запазват виталността си<sup>(16)</sup>. Има данни, че при класическите технологии за криоконсервация на клетъчни култури (бавно замразяване под защитата на DMSO и бързо размразяване) се наблюдава спонтанна диференциация на ЕСК<sup>(18)</sup>.

Независимо от гореспоменатите трудности, има доста съобщения за успешна криоконсервация на чЕСК. Колонии чЕСК се отделят от фидерния слой механично или чрез ензимна обработка. Отделените колонии се промиват и пренасят в среда за криоконсервация. Замразяването се извършва най-често с помощта на програмен замразител (бавни скорости на охлаждане). В последните години се появиха данни за успешна витрификация (свръхбързо замразяване) на чЕСК<sup>(19-21)</sup>. Отчита се, че ефективността на метода е по-висока от тази на програмното замразяване<sup>(22)</sup>. При витрификацията най-често се използват криопротективни среди и режими, близки до тези за предимплантационните ембриони.

### Характеризиране на чЕСК

Отличителна черта на ЕСК е тяхната тотипотентност, т.е. способност да се диференцират във всички видове клетки, тъкани и органи на възрастния организъм. Това обяснява и огромният интерес на учените към този вид клетки. В резултат на задълбочени проучвания са установени редица свойства, характерни за чЕСК. На първо място – това е високият им пролиферативен потенциал и теломеразна активност. Теломеразата е рибонуклеопротеин, добавящ крайни повтори към теломерите на хромозомите, като по този начин поддържа

дължината им на постоянно ниво. С този ензим е свързана "безсмъртността" на ЕСК.

За характеризиране на линиите чЕСК наред с кариотипизирането се изследва и експресията на различни маркери<sup>(23)</sup>. Основните клетъчно-повърхностни маркери, които се изследват за недиференцираните чЕСК са:

- Алкална фосфатаза (маркер за продължаваща пролиферация на клетките);
- SSEA-3 и SSEA-4 (повърхностни стадийспецифични антигени);
- TRA-1-81, TRA-1-60 (повърхностни антигени, открити първоначално в клетките на човешки ембрионални карциноми);
- OCT-4 (POU-транскрипционен фактор, регулиращ тотипотентността на ембрионалните клетки).

Характерно за чЕСК е, че не експресират SSEA-1<sup>(24)</sup>. Този маркер се използва като негативен контрол в изследванията.

### Какви са перспективите пред използването на чЕСК

Макар че малигнизирани линии човешки клетки като цяло са общодостъпни за експерименти, наблюдава се липса на първични диплоидни култури. Това прави чЕСК ценен и потенциално неизчерпаем източник на диференцирани нетрансформирани клетки с нормален кариотип за нуждите на изследователите. ЕСК са превъзходна система за определяне функциите на гените в процеса на диференциация. Все повече екипи, работещи в областта на генното инженерство, клониране и др. съвременни области на науката се ориентират към използването на ЕСК.

Способността на чЕСК да се диференцират във всички видове клетки на възрастния организъм обяснява огромният интерес към тях. В "in vitro" условия при отделяне от фидерния слой това свойство на чЕСК започва да се проявява с образуването на ембрионидни тела, които представляват сферични конгломерати от клетки, намиращи се на начален стадий на диференциация. Структурата на ембрионидните тела е близка до тази на ембрионите на ранен постимплантационен стадий. При пренасянето им върху повърхност, покрита с желатин, те се прикрепят към субстрата и започва процес на миграция на клетките. След около 10-дневно култивиране се образуват много диференцирани производни - предшественици на "възрастните" клетки. Процесът на диференциация в този случай има хаотичен характер.



Установено е, че клетките в процеса на миграция от ембрионните тела са особено чувствителни към въздействието на различни индуктори на диференциацията. Поради това основно внимание учените отделят на изследване на факторите, повлияващи диференциацията в определено направление. Знае се, че такива растежни фактори, като активин-А и TGF $\beta$ -1 предизвикват диференциация предимно в производни на мезодермата, EGF, BMP-4, bFGF - в производни на мезо- и ектодермата, NGF - в производни и на трите вида зародишни тъкани и т.н. В последните години се увеличават съобщенията за успешна насочена диференциация на чЕСК в определен вид клетки и тъкани (нервни клетки, кожа, кератиноцити, мускулни клетки и др.)<sup>(25, 26)</sup>

Възможността за насочена диференциация на чЕСК в инсулинпродуциращи клетки дава надежда на много болни от диабет. Около 5-10% от пациентите страдат от тип I на заболяването. Тази форма на диабета се дължи основно на аутоимунно разрушаване на  $\beta$ -клетките на панкреаса, с последваща инсулинова недостатъчност и пълна зависимост от лечението с екзогенен инсулин. Засега единственият кардинален метод за лечение на диабет I тип е трансплантацията на Лангерхансови острови. Достъпността на метода е ограничена поради липсата на донорски материал. Линиите чЕСК могат да станат неизчерпаем източник на материал за клетъчната терапия на такива болни. Още през 2001 г. екип израелски учени доказва потенциала на чЕСК да се диференцират в инсулинпродуциращи клетки<sup>(10)</sup>

Друго активно проучвано направление е възможността за получаване на кардиомиоцити от чЕСК. "Възрастните" кардиомиоцити излизат от клетъчния цикъл и не могат да се регенерират. Значителните загуби на кардиомиоцити са невъзстановими и водят до развитието на прогресираща сърдечна недостатъчност. Нов терапевтичен подход към лечението на това заболяване е увеличаването на функционалната активност на миоцитите в района на некроза чрез имплантация на миогенни клетки. През 1996 г. Американски учени от Института по кардиология в Индианополис разработват оригинален метод за получаване на кардиомиоцити от миши ЕСК. През август 2001 г. в *The Journal of Clinical Investigation* е публикувана статия от израелски учени, които съобщават за получаването на кардиомиоцити от чЕСК.

Интерес представляват изследванията, свързани с получаването на нервни клетки. Показано е, че

чЕСК могат успешно да се диференцират "*in vitro*" в неврони, астроцити и олигодендроцити<sup>(27)</sup>. Получените от чЕСК невроепителниални клетки притежават фенотипен профил, подобен на тези във възрастния организъм и експресия на SOX1, SOX2 и SOX3 гени. Те са позитивни за Nestin /неврален интермедиален филаментов протеин/ и Musashi-1 (неврален РНК-свързан протеин)<sup>(28)</sup>. Получените "*in vitro*" зрели неврони експресират също така NF-L (белтък, характерен както за зрелите, така и за незрели неврони), NF-N (протеин в зрелите неврони), допаминови рецептори DRD-1 и серотонинови рецептори 5HT2A и 5HT5A, DDC (декарбоксилаза - ключов ензим, участващ в синтеза на невротрансмиторите) и др. Установено е, че добавянето на ретиноева киселина и нервни растежни фактори водят до увеличаване на количеството получени от чЕСК неврони спрямо контролата от 21% до 52 и 39% съответно. Научните достижения в тази област дават надежди за лечението на такива заболявания като болестите на Паркинсон и Алцхаймер, черепно-мозъчни травми, множествена склероза, инсулти и др.

Хемопоетичната диференциация на чЕСК може да има важно терапевтично значение, тъй като ще осигури получаването на неограничени количества еритроцити и тромбоцити за трансфузия и хемопоетични СК за трансплантация. Установено е, че чЕСК могат да се диференцират "*in vitro*" в хематопоетични прекурсори<sup>(29)</sup>. Методологията включва култивиране със стромални клетки и използването на цитокинови "коктейли", VEGF и BMPs.

Наскоро учени от университета в Нюкасъл съобщиха за раждането на мишки след оплождане, настъпило с получени от ЕСК сперматозоиди. Това е още едно доказателство за плурипотентността на ЕСК.

Като цяло може да се отбележи, че чЕСК са изключително привлекателен обект за нуждите на регенеративната медицина. Трансплантацията на ЕСК или получени от тях деривати не предизвиква имунна реакция от страна на реципиента<sup>(30)</sup>. Вече се провеждат експерименти по пренасяне на ядра на соматични клетки в ЕСК. Получените хибриди притежават генотипа на донорската соматична клетка, запазвайки при това свойствата на реципиентните стволни клетки<sup>(31)</sup>. Получаването на гамети от СК дава надежда на много безплодни двойки да се сдобият със собствено дете. В момента в много страни (Великобритания, Япония, САЩ и др.) се

оборудват лаборатории за създаване на годни за клинично използване линии чЕСК. Неотдавна сингапурската компания ESI обяви, че е създала 4 нови линии чЕСК, предназначени специално за клиничната практика. Учените предполагат, че в близко бъдеще с помощта на ЕСК ще бъдат постигнати значителни успехи в лечението на над 70 заболявания при човека. Всичко това предполага разширяване и задълбочаване на изследванията в тази важна за науката и медицината област.

#### **Финансиране и законова регулация на изследванията с чЕСК**

Следва да се отбележи, че правителствата на повечето страни разбират важността и подкрепят изследванията в областта на чЕСК. През последните седем години Европейският Съюз (ЕС) е отпуснал около 8 млн. евро за девет проекта за изследване на стволови клетки в Белгия, Швеция и Великобритания. Наскоро (24 юли 2006 г.) министрите от страните членки на съюза приеха решение да продължат финансирането на подобен род експерименти до 2013 г. Най-активно това решение бе подкрепено от Белгия, Финландия, Франция, Испания, Швеция, Великобритания и Португалия. В рамките на над 50-милиардния научен бюджет на ЕС ембрионалните експерименти ще бъдат финансирани с около 0.4% от 6-те милиарда евро, предвидени за развитие на медицината. Останалите европейски държави също подкрепят разработките в тази област (включително и нечленки на ЕС - напр. Швейцария, Русия и др.). Против финансирането на изследванията по чЕСК или за частичното му ограничаване са единствено Германия, Австрия, Италия, Литва, Люксембург, Малта, Полша и Словакия. Това са предимно страни със силно влияние на католическата църква, която е против изследванията с човешки ембриони. Основните морални и религиозни догми са свързани с въпроса дали унищожаването на човешки ембриони, независимо че са на по 5-6 дни, е научна работа или убийство. За опонентите бластоцистът не е просто струпуване на клетки, а човешко същество и затова е неморално убиването му, дори в името на прогреса<sup>(32)</sup>.

В САЩ по данни от проучвания на общественото мнение 70% от жителите подкрепят изследванията в областта на чЕСК. Отчитайки отношението на обществото към тази тема, на 18 юли 2006 г. Сенатът на САЩ прие Закон за отделяне на допълнителни средства за изследвания на чЕСК. По мнението на повечето сенатори подобни научни разработки откриват нови възможности за лечение на такива заболявания, като болестите на Паркинсон и

Алцхаймер, травми на гръбначния мозък, диабет и др. Няколко дни по-късно президентът Буш за първи път от пет години се възползва от правото си на вето и стопаира този закон. В момента предстои второ гласуване на закона.

В България няма закон, регулиращ изследванията в областта на чЕСК. Както за научни експерименти, така и в медицинската практика (за трансплантации) в нашата страна се използват основно регионални СК, получени от кръв или костен мозък. Независимо от подобрите перспективи, изследванията върху чЕСК все още са малко. Ограниченията са най-вече от финансов и организационен характер (трудности с получаване на материала - предимплантационни ембриони, колаборация между звената и др.). Подобен род изследвания се провеждат в Института по биология и имунология на размножаването в рамките на проект, наблюдаван от БАН (*Пилотни криобиологични проучвания на човешки ембрионални стволови клетки*). Като цяло българското правителство подкрепя изследванията в областта на чЕСК. Това се посочва в българската позиция по повод на научните изследвания, включващи човешки ембрионални стволови клетки, която бе представена от вицепремиерът и министър на образованието и науката Даниел Вълчев на извънредното заседание на Съвета на Европейския съюз по конкурентоспособност в частта "научни изследвания" през юли в Брюксел. В становището се уточнява, че България напълно подкрепя позицията да бъдат финансирани научни дейности, целящи създаването и използването на човешки ембриони за изследователски нужди или за добиване на стволови клетки, включително чрез ядрен трансфер, като това напълно отговаря на българския Закон за здравето. Несъмнено приемането на закон за Асистираната репродукция, регулиращ и използването на чЕСК, би допринесло за разширяването и регламентирането на този род изследвания.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Odorico J.S., Kaufman D.S., Thomson J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem cells* 2001, 19: 193-204
2. Hubner K., Fuhrmann G., Cristenson L.K. et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 2003, 300: 1251-1256
3. Amit M., Carpenter M.K., Inokuma M.S. et al. Gene expression patterns in human ES cells. *Develop. Biol.* 2000, 227: 271-278
4. Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 1981, 292: 154-156
5. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al. Embryonic stem cell line from human blastocysts. *Science* 1998, 282: 1145-1147.
6. Reubinoff B.E., Pera M.F., Fong C-J. et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology* 2000, 18: 399-404
7. Xu C., Inokuma M.S., Denham J. Et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 2001, 19: 971-974
8. Amit M., Margulets V., Segev H. et al. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biology of Reproduction* 2003, 68: 2150-2156
9. Zwaka T.P. and Thomson J.A. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 2003, 21: 319-321
10. Assady S.Maor G., Amit M. et al. Insuline production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001, 50:1691-1697
11. Kehat I., Gepstein A., Spira A. et al. High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction. *Circulation Research* 2002, 91: 659-661
12. Schultz T.S., Palmarini G.M., Noggle S.A. et al. Directed neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Neuroscience* 2003, 4:27-41
13. Genbacev O., Krtolica A., Zdravkovic T. et al. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. *Fertility and Sterility* 2005, 6: 1517-1529
14. Lee J.B., Song J.M., Park J.H. et al. Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells. *Reproduction* 2004, 128: 727-735
15. Guidelines for Human Embryonic Stem Cell Research. National Akademie Press 2005
16. Human Embryonic Stem Cell Protocols. BresaGen Inc., 2004, 19
17. Tompers M.D., Laboskky A.P. Electroporation of Murin Embryonic Stem Cells: A Step-by-Step Guide. *Stem Cells* 2004, 22: 243-249
18. Robertson E.J. (ed) Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A practical Approach. URL Press, Oxford, 1987: 71-112
19. Reubinoff B.E., Pera M.F., Vaita G., Trounson A.O. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Human Reproduction* 2001, 16: 2187-2194
20. Zhou C., Mai Q., Li T. et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification. *Chin Med J* 2004, 117: 1050-1055
21. Todorov P, Konakchieva R., Dimitrov J., Chub N., Petrenko Y. Vitrification of human embryonic stem cells. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 2005, 58, 9:1095-1100
22. Shaw J.M., Jones G.M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Human Reprod. Update* 2003, 9: 583-605
23. Cai J., Chen J., Miura T. et al. Assessing self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006, 4: 516-530
24. Ginis I., Luo Y., Miura T. et al. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology* 2004, 269: 360-380
25. Kiessling A.A., Anderson S.C. Stem cells: an introduction to the science and therapeutic potential. Jones and Bartlett Publishers Intern., USA, 2003: 223p
26. Stoikovitch M., Lako M., Strachan T., Murdoch A. Derivtion, growth and application of human embryonic stem cells. *Reproduction* 2004, 128: 259-267
27. Colombo E., Gianelli S.G., Galli R. et al. Embryonic stem cell-derived versus somatic neural stem cells: a comparative analysis of their developmental potential and molecular phenotype. *Stem cells* 2006, 24: 825-834
28. Shin S., Mitalipova M., Noggle S. et al. Long-term proliferation of human embryonic stem cell-derived neuroepithelial cells using adherent culture conditions. *Stem Cells* 2006, 24: 125-138
29. Vodyanic M.A., Bork J.A., Thomson J.A. et al. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: Efficient production in the co-culture with stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* 2005, 105: 617-626
30. Drukker M., Katchman H., Katz G. et al. Human embryonic stem cells and their derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. *Stem cells* 2006, 24: 221-229
31. Strelchenko N, V Kukhareno, A Shkumatov et al. Reprogramming of human somatic cells by embryonic stem cell cytoplasm. *Reproductive Medicine Online* 2006, 1: 107-111
32. Schwartz F.H., Rae S.B. An approach to the etical donation of human embryos for harvest of stem cells. *Reproductive BioMedicine Online* 2006, 6: 771-775

Адрес за кореспонденция:

Пламен Тодоров, дб

Институт по биология и имунология на размножаването-БАН  
София 1113, бул. "Цариградско шосе"73

E-mail: plamen@ivf.zzn.com

## НОВИНИ ОТ МРЕЖАТА

д-р Г. Николов  
МЦ "РепроБиоМед" - София

## NEWS FROM THE NET

Dr G. Nikolov  
Medical center "ReproBioMed" Ltd - Sofia

### **По-ниска успеваемост след IVF/ICSI при размразени овоцити**

Известно е, че човешките овоцити са труден обект за криоконсервация, особено когато се ползват процедури за бавно замразяване. В тези случаи резултатите след ICSI на размразени яйцеклетки са далеч по-лоши в сравнение с тези при свежи. При положение, обаче, че овоцитите са били подложени на витрификация, картината става малко по-различна.

Екип, ръководен от Кутлак Октай от *Weill Medical College* на *Cornell University* в Ню-Йорк, сравнява успеваемостта след IVF/ICSI между размразени и свежи яйцеклетки в едно проучване (мета-анализ), публикувано във **Fertility and Sterility 2006; 86: 70-80**. Както може да се очаква, резултатите след ICSI при свежи овоцити по отношение на оплождане, имплантация и раждане/инжектиран овоцит, са значително по-добри в сравнение с тези при размразени (OR = 2.22, 4.66, 1.5 респ.). Прави впечатление, че тези отношения, са по-ниски, когато се използва витрификация като метод за криоконсервация.

Изводите от това проучване са:

1. Въпреки, че бавното замразяване на овоцити е алтернатива за запазване на фертилитета при определени медицински индикации, все още не е оправдано широкото му използване;
2. Успеваемостта се подобрява, когато се ползва витрификация като метод за криоконсервация, но бъдещите проучвания ще покажат доколко процедурата е ефикасна и безопасна.

### **Възрастта на мъжете е от значение за риска от спонтанен аборт**

В едно изследване, проведено от американски учени от катедрата по "Обществено Здраве" на Колумбийския университет и Ню-йоркския психиатричен институт, се сочи, че жените забременели от по-възрастни мъже са с повишен риск да загубят бременността си. В това проучване върху 14,000 жени, публикувано в

*Obstetrics and Gynaecology, 2006; 108: 369-377* се твърди, че е налице риск за спонтанен аборт с 60% по-висок при жени, забременели от бащи на възраст над 40 г. За сравнение: OR при мъже на 40 и 25 г. са съответно 1.6 ( $p < 0.003$ ) и 0.59 ( $p < 0.0001$ ) (където  $OR < 1$  е благоприятно);

Според учените и мъжете имат "биологичен часовник" и шансовете им за здраво потомство значимо намаляват след 40 г. възраст. Според Д-р Карин Клайнхаус този факт следва да не бъде подценяван, особено в Западните страни, където реализирането на репродуктивната функция е значително забавена. Нещо повече, ASRM (The American Society for Reproductive Medicine) е приела 40 г. за горна възрастова граница за спермодарителите в САЩ поради повишения риск от генетични аномалии в потомството.

Изследователите заключват, че макар възрастта на жената да е водеща при случаите на неуспешно забременяване, спонтанни аборти и генетични аномалии (вкл. синдром на Даун), възрастта на мъжа също може да допринесе значително за това.

### **Предстоящи международни научни форуми**

1. Serono Symposia International; Amsterdam, The Netherlands; 10-11 ноември 2006 г.; на тема: "АРТ в 21ви век: време за преоценка и нови хоризонти". Застъпени са следните под-теми:
  - ембриотрансфер,
  - имплантация,
  - крио-биология и АРТ,
  - резултати след IVF-ET,
  - бъдещи перспективи за АРТ при хората.

Повече информация на адрес:

[www.seronosymposia.org](http://www.seronosymposia.org)

Адрес на секретариата:

[info@seronosymposia.org](mailto:info@seronosymposia.org)



2. ESHRE Campus 2007, Luebeck, Germany; 12-14 януари 2007 г.; съвместна работна среща организирана от University of Luebeck, University of Bonn, the Dutch-speaking Brussels Free University и от ESHRE SIG "embryology" на тема: "Култивиране на фоликули, ин витро матурация и криоконсервация - от базисни изследвания до клинично приложение".

*Повече информация на адрес:*

*[www.eshre.com](http://www.eshre.com)*

*Адрес на секретариата:*

*[info@eshre.com](mailto:info@eshre.com)*

3. The 9<sup>th</sup> World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynaecology and Infertility, Barcelona, Spain; 22-25 март 2007 г.; на този пореден конгрес, спонсориран от IBSA и Medicult, паралелно ще текат 3 симпозиума, единият от които е на теми, касаещи противоречия в областта на АРТ (вкл. практически аспекти на IVF, PGD, IVM и крио-консервацията).

*Повече информация на адрес:*

*[www.comtecmed.com/cogi/cogi9](http://www.comtecmed.com/cogi/cogi9)*

*Адрес на секретариата:*

*[cogi9@comtecmed.com](mailto:cogi9@comtecmed.com)*

4. IFFS, 19th World Congress on Fertility and Sterility, Durban, South Africa; 29 април - 03 май, 2007 г.; организиран от Международната Федерация на Дружествата по Фертилитет. Ще бъдат застъпени редица интересни теми, включително:

- PGD;

- Нови насоки в АРТ (култивиране на бластоцисти и SET, IVM и др.);

- Новости при ICSI;

- Стволовите клетки в репродуктивната медицина;

- Криопрезервация на овоцити и яйчникова тъкан и др.

*Повече информация на адрес:*

*[www.iffs2007.org.za](http://www.iffs2007.org.za)*

*Адрес на секретариата:*

*[gills@turnergroup.co.za](mailto:gills@turnergroup.co.za)*







## ДЕСЕТГОДИШЕН ЮБИЛЕЙ ОТ РАЖДАНЕТО НА ДОЛИ И НА СОМАТИЧНОТО КЛОНИРАНЕ\*

Д-р Христо Одисеев, дмн

### Кратка история

Думата клониране е излязла под перото на биолога Херберт Вебер в 1903 г. С нея той обозначава неполовата репродукция при растенията чрез издънка от "майка". По-късно, когато биолозите започват да култивират клетки на бактерии, растения и животни, с нея назовават всяко потомство, което произлиза чрез безполово делене от една клетка и има нейната генетична наследственост.

Принципът на клониране чрез нуклеарен трансфер е формулиран от германеца Ханс Спеман в 1936 г., а първата енуклеация (отстраняване на ядрото) на овоцит и трансфериране в него на ядро от друга клетка, е проведено в 1952 г. от американеца Роберт Бригс и неговия студент Томас Кинг, последвано от много други изследователи. Все още в тази епоха се работи с ембрионални клетки, овоцити и ядра на клетки от нисши животни, най-често жаби. След раждането на овцата Доли, думата клон се използва за обозначаване на линия животни, получена чрез безполова репродукция от единствен родител, използваната техника се нарича клониране, а новосъздаденото животно е клон на родителя си.

### Раждането на Доли

Доли е получена през юли 1996 г. чрез сливане на енуклеирана яйцеклетка с ядро на зряла, соматична клетка. Овоцитът, взет от овца с черна глава е енуклеиран и в него е пренесено ядро от клетка, взета от вимето на друга, чисто бяла овца. След клонирането, клетката е вмъкната в яйцепровода на трета овца за няколко дни, до получаване на бластоцист, който е поставен в матката на "майка носителка" - четвърта овца (бяла с черна глава). След 5 месеца се ражда чисто бялата Доли, "копие" на овцата от чието виме е взета зрялата клетка.

Доли преживява почти 7 години и ражда няколко агнета. През 2003 г. заболява от вирусна пневмония и се налага да бъде евтаназирана. В момента може да бъде видяна препарирана в природния музей на Единбург. Доли загива от една банална инфекция, но самата тя не може да се нарече "банална". Тя бе първото млекопитаещо животно, създадено чрез соматично клониране и събуди надежди, граничещи с фантастиката.

След Доли на бял свят се появяват три телета, след тях агнето Маргарита, следвано от различни други животни (овце, кози, свини, мишки, плъхове, телета, прасета, зайци, котки, муле, кон и накрая куче). Днес не се знае точно колко животни са "родени" по-този начин. Не се знае и колко лаборатории в света се занимават с клониране.

### Равносметката

Изминаха 10 години от първото соматично клониране. Натрупа се значителен опит, достатъчен за една преценка. Оказа се, че соматичното клониране е сложен и нелесен процес, че на всички етапи съществуват трудно преодолими пречки. Създателите на Доли са използвали 443 овоцита, успешно са клонирали 277, но само 29 от тях се развиват до бластоцисти и само една достига до раждане на живо и здраво животно. Дори сега, тази пречка не е преодоляна. Общо взето, успеваемостта на метода е не повече от 5%.

Противно на това, което се очакваше, се оказа, че получените клонове не са копие на зрелите донори. Овоцитите са доставяни от много животни. Макар и енуклеирани, те съдържат митохондриална ДНК, която се намесва в развитието на ембриона. Освен това, в периода на изкуственото култивиране, се наслоява пренареждане на хромозомите, което води до промени на генома, идващ от зрялата клетка. Две клетки, взети от един донор, започват да се различават генетично. Също така, хромозомите могат да претърпят химични промени на ДНК. Модификации могат да се дължат и на влияние на външната среда. Така че понятието *клон = точно копие* е едно пожелание.

Освен това, около 30% от клонираните животни развиват т.нар. *клонов синдром*: увеличено тегло, несъразмерно големи органи, смущения в метаболизма. Дори клонове, получени от един донор, показват разлика в теглото до 25 кг. Често се налага раждане чрез секцио. Около 30% от новородените умират в първите 3 месеца.

Тези резултати охладиха големия оптимизъм, който в началото бе вдъхновил изследователите. Надеждата, че соматичното клониране ще се използва за масово селектиране в животновъдството за сега остава напразна.

Адрес за кореспонденция:  
Д-р Христо Одисеев, дмн  
тел.: (02) 865 55 32  
E-mail: odisseev@abv.bg

\* Статията е публикувана със съкращения

## 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 (напр. 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.

### *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.zzn.com

Тел.: 088 870 3786 (д-р Г. Николов)

088 821 7095 (П. Тодоров)



# Женствени от изгрева

## до залеза



# UTROGESTAN<sup>®</sup> 100mg

Progesterone

A 136/01.06.06

Хормонално лечение на нарушения  
В бременността  
и В менструалния цикъл



По лекарско предписание  
Кратка характеристика  
на продукта 688/17.01.06 г.  
за пълна информация

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

„ЕКОФАРМ“ ЕООД, 1421 София бул. „Черни Врх“ № 14, бл.3, тел. 963 15 96, 963 15 97, факс: 963 15 61



# ELTA 90

- ПРОДУКТИ ЗА СЪВРЕМЕННАТА ЛАБОРАТОРНА ДИАГНОСТИКА И НАУКА
- АПАРАТУРА
- РЕАКТИВИ
- КОНСУМАТИВИ

● Тел.: 02/983 96 49; 02/983 22 09; Факс: 02/983 22 11; E-mail: [elta90@dir.bg](mailto:elta90@dir.bg); [www.elta90.com](http://www.elta90.com)



# Прецизният контрол зависи от гъвкавото дозиране на лутеинизиращия хормон (LH)



Luveris® е единственият по рода си, без аналог лутеинизиращ хормон (LH).

Luveris® осигурява уникална гъвкавост на дозиране, тъй като може да бъде използван независимо от прилаганата доза r-h FSH.

Luveris® - единственият LH, комбиниращ най-доброто от рекомбинантната технология.

За първи път постигане на прецизен контрол на LH.

За повече информация можете да се обърнете към официалния представител на Serono International S.A. за България: Търговска Лига-НАЦ, АД. София 1172, бул. "Г.М.Димитров" 1, телефон за контакт: 02/ 9603 643  
Luveris® е регистрирана търговска марка на Serono Group of Companies.



## Luveris®

LUTROPIN ALFA

ЗА ПАЦИЕНТИ, КОИТО СЕ НУЖДАЯТ ОТ  
ЛУТЕИНИЗИРАЩ ХОРМОН (LH)

 **serono**  
biotech & beyond



# В ДЕНЯ НА hCG ПРИЛОЖЕНИЕ - ДАЙТЕ НАЙ-ДОБРОТО ОТ СЕБЕ СИ



Ovitrelle® е единственият hCG, който предлага постоянна и надеждна клинична ефикасност благодарение на рекомбинантната технология.

Ovitrelle® постига по-добра ефективност от уринарния hCG спрямо броя на узрелите яйцеклетки и постигнатите нива на прогестерон<sup>1-3</sup>.

Ovitrelle® е значително по-добре толериран в сравнение с уринарния hCG и се прилага лесно под формата на подкожна инжекция.

Всъщност Ovitrelle® притежава всички предимства, които можете да използвате от най-съвременната рекомбинантна технология.

 **Ovitrelle®**  
choriogonadotropin alfa  
**Ovitrelle® (хорионгонадоптрин алфа)**