

ЕМБРИОЛОГИЯ

Embryology



ISSN 1312-7349

ИЗДАВА БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ
ПО РЕПРОДУКТИВНА ЧОВЕШКА ЕМБРИОЛОГИЯ

ТОМ 2 КНИЖКА 1
2007

**Колко мечти
можем да си позволим?**

Merional[®]

високопречистен ЧМГ/FSH+LH/

✓ **ВИСОКО ПРЕЧИСТЕНИ**

ГОНАДОТРОПИНИ

✓ **ИЗКЛЮЧИТЕЛНА**

ИКОНОМИЧНОСТ

✓ **ПОВЕЧЕ ЦИКЛИ**

✓ **ЕФИКАСНОСТ**

✓ **ПОДКОЖНО**

ИНЖЕКТИРАНЕ



Fostimon[®]

високопречистен FSH



Повече от преди!



www.mldtrading-bg.com

Представителство
МЛД Трейдинг ЕООД
тел. 02/ 490 03 42



СЪДЪРЖАНИЕ:

Витрификация на зиготи: научна основа на асептична технология и нейното приложение при овоцити и бластоцисти	3
---	----------

В. Исаченко, Ф. Ноурот, М. Монтаг, С. Яковенко, П. Тодоров, Е. Исаченко

Епигенетично моделиране на ембрионалното и постнаталното развитие	16
--	-----------

Г. Георгиев, Р. Конакчиева

Регулация на имплантацията и биомаркери за определяне на маточната рецептивност	21
--	-----------

Д. Гуленова, Г. Николов

CONTENTS:

Vitrification of pronuclear embryos: Research ground of aseptic technology and application for oocytes and blastocysts	3
---	----------

V. Isachenko, F. Nawroth, M.Montag, S. Yakovenko, P. Todorov, E. Isachenko

Epigenetic remodeling of embryonic and postnatal development	16
---	-----------

G. Georgiev, R. Konakchieva

Regulation of implantation and biomarkers for endometrial receptiveness	21
--	-----------

D. Gulenova, G. Nikolov

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 колеги и читатели,

През м. март 2006 г. Българската Асоциация по Репродуктивна Човешка Ембриология (БАРЧЕ), макар и предизвиквайки известни сътресения, получи своята първа изява на Конгреса по Стерилитет в Боровец чрез първия брой на сп. "Ембриология" и чрез участието на свои членове в конгресната програма.


Само една година по-късно...

Списание "Ембриология" издава вече своята 3^{-та} книжка. Тя е малко по-различна. В нея за пръв път се отпечатва оригинална статия от чужди автори и то като официална световна премиера. Темата за витрификация на човешки зиготи е интересна и особено за някои страни (напр. Германия) е от изключително значение, където е възможно предимплантационни ембриони да бъдат съхранявани чрез криоконсервация единствено, ако са на стадий два пронуклеуса. Материалът е на английски език и по изричното настояване на авторите не е преведена, за което се надявам да проявите разбиране.

Предстои (поредния) "8^{-та} Национален конгрес по стерилитет, контрацепция, хормонозаместителна терапия и гинекологична ендоскопия с международно участие" - Боровец, 17 - 19 март 07. На този конгрес се очакват над 300 делегати от България и чужбина, включително от Белгия, Германия, Израел, Италия и Холандия. Бих искал от името на БАРЧЕ да покана всички, които проявяват интерес в областта на асистираните репродуктивни технологии, биологията на репродукцията, генетиката, имунологията на репродукцията и др. свързани области да участват на този изключително голям научен форум.

Една година по-късно БАРЧЕ е вече търсен партньор при договаряния с НЗОК, при изготвяне на нормативната база за регулиране на асистираната репродукция в България, при организирането на споменатия национален конгрес и др. инициативи.

Да, за една година могат да се променят много неща... но само с Вашето желание и участие. Благодарим Ви сърдечно!



Д-р Георги Николов,
(главен редактор)

VITRIFICATION OF PRONUCLEAR EMBRYOS: RESEARCH GROUND OF ASEPTIC TECHNOLOGY AND APPLICATION FOR OOCYTES AND BLASTOCYSTS

V, Isachenko¹, F. Nawroth², M. Montag¹, S. Yakovenko³, P. Todorov⁴, E. Isachenko¹

¹*Department of Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University of Bonn, Bonn, Germany*

²*Endocrinologicum Hamburg, Hamburg, Germany.*

³*Clinik AltraVita, Moskow, Russia*

⁴*Institute of Biology and Immunology of Reproduction, Sofia, Bulgaria*

As it is not legal to cryopreserve an oocyte after fusion of the pronuclei or due to presence of ethical difficulties in some countries, development of a refined method for cryopreservation of human pronuclear embryos is an important topic. To date in some centers numerous babies were born after transplantations of embryos developed from frozen pronuclear embryos⁽¹⁾. However, with regard to the low efficacy of the oocyte freezing technique, the "frozen oocyte" pregnancy rate is lower than the one from fresh pronuclear embryo⁽²⁾. Conventional (slow) freezing of human pronuclear and developing embryos has been the most widely used method until now^(2,3). However, there have been several reports of the successful cryopreservation of human pronuclear embryos by direct plunging into liquid nitrogen, so called vitrification⁽⁵⁻¹³⁾. This method now is an object of intensive investigations in numerous laboratories taking into account that the protocol of vitrification includes two parameters: the vitrification process occupies some minutes only in contrast to the long-time consuming conventional method, and this method needs not a special equipment comparatively with conventional freezing.

Our protocol of vitrification of human pronuclear embryos includes following parameters: (i) step-wise saturation by and removal of permeable cryoprotectants, using a small amount of vitrification medium that allows quick warming of cells, (ii) full isolation of vitrification medium from contact with liquid nitrogen, (iii) short contact of cells with permeable cryoprotectant dimethyl sulfoxide (DMSO) at decreased temperature for reduction of parthenogenetic and toxic effect. The research ground of technology is described below.

Step-wise saturation by and removal of permeable cryoprotectants.

According to protocols of vitrification, human oocytes and embryos, once thawed, are placed in hypertonic disaccharide solution (normally sucrose) to remove permeable cryoprotectants before trans-

ferring the cells to an isotonic culture medium. This rehydration process is generally conducted by gradual dilution of the permeable cryoprotectants through exposure in three steps to 0.5, 0.25 and 0.125 M sucrose^(5,6) or to 1.0, 0.5 and 0.25 M sucrose⁽⁹⁾. Four-step dilution protocols involving exposure to 1.0, 0.5, 0.25 and 0.125 M sucrose have also been described^(8,10). In contrast, it has recently been possible to directly rehydrate vitrified ovine and bovine oocytes after thawing without the need for gradual dilution of the cryoprotectants⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

Viability of vitrified human pronuclear embryos after step-wise removal of cryoprotectants versus direct rehydration (with intensive osmotic processes) was studied⁽¹¹⁻¹³⁾. Embryo viability was assessed by their subsequent in vitro survival, post-transfer implantation rate and ultrastructural features. Following step-wise rehydration of embryos shown a high viability after vitrification/warming. Cytoplasm of embryos after vitrification/warming followed by direct rehydration the showed a dark, granular appearance; none of these oocytes developed to the two blastomere stage. The ultrastructure of both fresh and vitrified/step-wise re-hydrated pronuclear embryos was as described⁽¹¹⁻¹³⁾. The smooth endoplasmic reticulum (SER) of a fresh pronuclear oocyte is associated with mitochondria⁽¹¹⁾. The presence of small vesicles not associated with mitochondria was observed. Others demonstrated that intracellular structures of pronuclear embryos are very sensitive to cooling⁽¹⁷⁾ and vitrification⁽¹⁸⁾.

The negative effects of the cryopreservation process on human pronuclear embryos can be distributed on three groups: cooling, osmos and toxicity.

According to Sathanathan⁽¹⁷⁾, human cells seem less sensitive to cooling than oocytes of other mammalian species because they contain a small volume of lipids. However, our investigations show that the sensitivity of organelles in fertilized oocytes to cooling to 4°C changes with respect to the presence or

absence of cryoprotectants (Figure 1). The aim of our investigations was to examine the peculiarities of ultrastructural changes in pronuclear embryos cooled to low positive temperatures in the presence or absence of the cryoprotectant ethylene glycol⁽¹¹⁻¹²⁾. We investigated the basic cell organelles, such as mitochondria, and three types of smooth endoplasmic reticulum (SER): tubular, small vesicular, and large vesicular aggregates. The connections between SER vesicles and mitochondria, as well as the intensity of these aggregates (absence of connection with mitochondria) were determined. Cryoprotectants prevent the severe damage to intracellular organelles such as multiple vacuolizations, clustering of mitochondria, and deformation and disruption of nucleolar and plasma membranes. After vitrification, thawing and 1 h of exposure in CO₂-incubator, the presumably viable pronuclear embryos showed large SER vesicles associated with mitochondria, and small vesicles close to flattened, crescent-shaped mitochondria (Fig 1). Human pronuclear embryos are highly sensitive to cooling and low positive temperatures. Adding the cryoprotectant gives significant protection against damage of intracellular organelles (Fig 1).

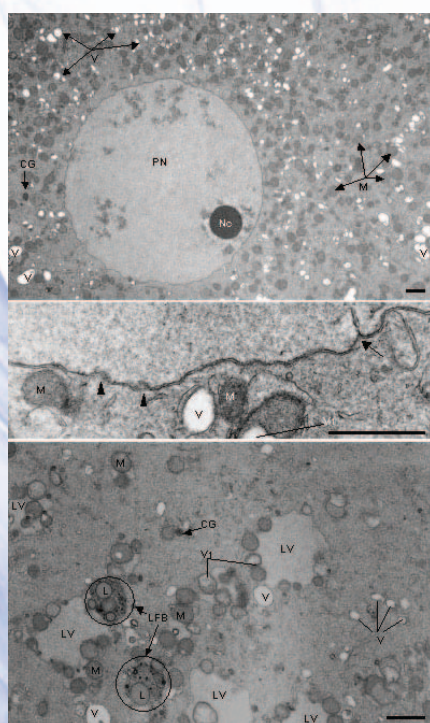


Figure 1. Electron micrograph of pronuclear embryo: cooled without cryoprotectants (above and middle) and vitrified with step-wise dilution of cryoprotectants (below). M, mitochondria; CG, cortical granules; PN, pronucleus; Nc, nucleolus; V, small vesicles of smooth endoplasmic reticulum; small vesicles of smooth endoplasmic reticulum encircled by flattened mitochondria; L, lipids, LV, large vesicles of smooth endoplasmic reticulum, associated with mitochondria; LFB, lipofuscin bodies. Arrows represent deformations of nuclear membrane, arrowheads show disruption of nuclear membrane. Scale bar = 1 μm.

We believe that the osmosis plays the central role through all negative effects of the cryopreservation process of human pronuclear embryos.

Figure 2 shows images of human pronuclear embryos that were vitrified, warmed and directly rehydrated with intensive osmotic processes. The cytoplasm was seen to be filled with a finely granulated substance with dark inclusions. Note the remains of membrane structures and a dense dark pulp with transparent (low density) membrane-bearing and membrane-free vesicles. The dark pulp is enveloped by membrane and is characteristic of the deformation and destruction provoked by the intense osmotic effects of direct rehydration. The cytoplasm shows transparent (low density) spots which are probably the result of the disruption of lysosomes that release their proteolytic contents, inducing lysis of the cytoplasmic matrix. The image shows the disruption of the pronucleus followed by rupture of the membranes first and nucleoli later.

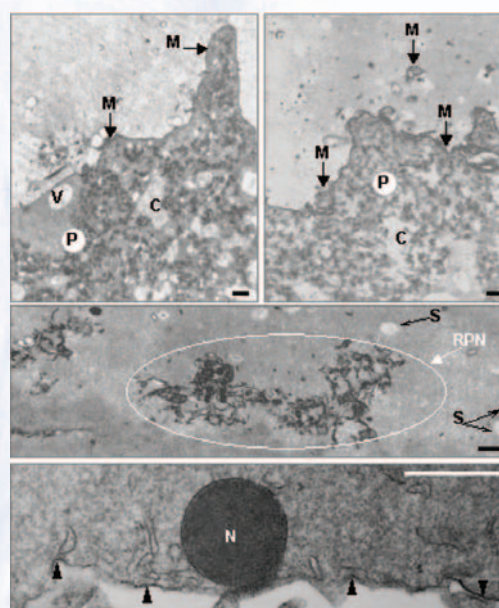


Figure 2. Electron micrograph of vitrified pronuclear embryo after thawing and direct rehydration. Note the deformation and disruption of the cytoplasmic membranes (M). (RPN) remains of the pronucleus, (S) low density spots, (C) cavity, (P) dark pulp, (V) vesicle, (N) nucleus, (arrowheads) pronuclear membrane remnants (envelope). Bar=1 μm.

The method of direct post-thaw rehydration induces lethal osmotic effects in human pronuclear embryos. Accordingly, the vitrification protocol for these embryos must include the step-wise dilution of the cryoprotectant. Taking into account that the saturation by cryoprotectants also is accompanying by osmotic processes, our aseptic technology includes step-wise mode of saturation by cryoprotectants.

Full isolation of small amount vitrification medium from contact with liquid nitrogen (aseptic mode).

Rall and Fahy⁽¹⁹⁾ with colleges have intensively published on vitrification including the influence of cooling and warming rates on survival of vitrified objects. Investigations of these authors evidenced that the rate of cooling during vitrification is secondary as long as it is fast enough to prevent crystallization. For example, for vitrification of 8-cell mouse embryos using solutions of different combinations of DMSO, acetamide, propylene glycol, glycerol in total concentrations from 5.5 to 6.54 M plus 6% polyethylene glycol, equally high survival rates were obtained at cooling rates ranging from about 15 to 2500°C/min⁽²⁰⁾. Differential scanning calorimetry compared the appearance of the solutions using phase-contrast cryomicroscopy. No crystallization was observed when these solutions were cooled at rates greater than 10°C/min⁽²¹⁾. High survival rates of mouse embryos after vitrification with cooling rate of at least 10°C/min using vitrification solution 6.5 glycerol plus 6% polyethylene glycol was reported⁽²⁰⁾.

In practice there are two different technologies of cooling of cells before storage in liquid nitrogen; cooling by direct plunging into liquid nitrogen (decreasing of temperature from some thousands to some tens thousands °C/min^(15, 22-27) and cooling in vapor of liquid nitrogen before long term storage in liquid nitrogen (at about 200°C/min)⁽²⁸⁻³⁴⁾. This methodology of "slow" cooling of cells before storage in liquid nitrogen is evidence for the secondary role of parameter "speed of cooling" for vitrification of oocytes and embryos.

Another important parameter of vitrification is the speed of warming after storage in liquid nitrogen. Formation of crystals in vitrified solution during warming (so called devitrification) is associated with the death of embryos after conventional cryopreservation⁽²¹⁾. The same negative effect of "slow" warming can be observed at vitrification. For example, a stable glassy state of vitrified-warmed solution as well as a good viability of mouse embryos was obtained using moderate cooling and warming rates (respectively > 20 and > 100°C/min⁽²⁰⁾. All combinations of "slow" or "quick" cooling with "slow" warming were attributed to decreasing viability of vitrified mouse embryos^(19,30). We showed the importance and efficacy of elevated warming rate during vitrification of porcine GV-oocytes⁽⁴⁵⁾ and absence of visible crystal formation when the warming/cooling proportion was higher than 1.3⁽³⁶⁾.

The majority of authors noted that the high effectiveness of different protocols for the vitrification of oocytes and embryos with decreased volumes of cooled medium, can be explained by the combination

of high speeds of cooling and warming^(22,23,33, 37-4). The results of our investigations with human oocytes do not support this point of view. For human GV-oocytes and pronuclear embryos and the relatively slow cooling rate in combination with rapid warming is an efficient "conventional" vitrification process in regard to survival rates and embryo development⁽⁴¹⁻⁴³⁾.

We could show in the past, that effective vitrification of ovine GV-oocytes is dependent on a combination of high speed of cooling and warming⁽²⁴⁾. However, using the regime "slow cooling - rapid warming" we observed no development of oocytes but excellent expansion of cumulus of these oocytes in contrast with "slow cooling - slow warming" when oocytes as well as cumulus cells were death after warming⁽²⁴⁾. This phenomenon can be explained by differences of cryo-properties (cryo-stability) of oocytes and cumulus cells in frame of the same mammalian species.

It was reported about vitrification of human embryos using fine diameter plastic micropipettes, which were cooled in vapour of liquid nitrogen before their location into a precooled cryotube. Similarly to our findings, this methodology also included the parameter "slow cooling" and "rapid warming"⁽⁴⁴⁾.

"Slow" cooling of biological objects can also be used for cooling of relatively large volume of cooled solution. To prevent the 0.25 ml straw from coming into direct contact with liquid nitrogen and eliminating the potential contamination risk associated with storage in liquid nitrogen, Kuleshova and Shaw⁽⁴⁵⁾ reported about "straw-in-straw" vitrification of mouse embryos. A standard 0.25 ml straw with column of vitrification medium was located into a 0.5 ml straw, which was hermetically closed before plunging into liquid nitrogen. However, this method, in contrast with the one described in this chapter, does not allow rapid warming of small volume of vitrification medium with simultaneous removal of cryoprotectant.

Our conclusion about the minor importance of the speed of cooling for vitrifying oocytes and embryos, can probably be applied to all reproductive human cells including spermatozoa. We recently reported that vitrification of human spermatozoa by fast (20000°C/min) or relatively slow (200°C/min) cooling with fast warming, results in similar post-thaw characteristics⁽⁴⁶⁾.

In the major point of the work about vitrification of cells in a small amount of vitrification medium, described technique included the direct contact between liquid nitrogen and the cells. In fact, any technology in reproductive biology and especially in medicine must ensure and guarantee a full isolation

of biological objects from microorganisms⁽⁴⁷⁾. Liquid nitrogen, which is used for storage of frozen materials, can be a source of contamination by these microorganisms⁽⁴⁷⁻⁴⁸⁾. Filtration or ultra-violet treatment of liquid nitrogen can not guarantee the absence of contamination of biological materials by viruses including AIDS virus and mykoplasmas. For example, the contamination of blood probes by hepatitis virus during the time of storage of probes in liquid nitrogen was reported⁽⁴⁸⁾. Different types of viruses, which are simple and very cryo-stable structures, may increase their virulence after direct plunging and storage in liquid nitrogen: hepatitis virus⁽⁴⁹⁾, papova virus⁽⁵⁰⁾, vesicular stomatitis virus⁽⁵¹⁾, herpes virus⁽⁵²⁾.

The aim of our investigations was to test the method of cryopreservation of human pronuclear embryos in straws, which are placed inside a hermetically closed container (larger straw), guarantees a complete isolation of embryos from liquid nitrogen and avoids potential contamination by pathogenic microorganisms. We found, that vitrification of human pronuclear embryos (Fig. 3) in open straws which are placed inside a hermetically closed container before plunging into liquid nitrogen, allows a reliable isolation of oocytes from liquid nitrogen and avoids a contamination by pathogenic microorganisms. Although this technique is associated with a relatively slow cooling rate, the developmental potential of these pronuclear embryos is not compromised if the thawing process involves rapid warming and simultaneous removal of cryoprotectants⁽⁴³⁾. For human pronuclear embryos and GV-oocytes the relatively slow cooling rate in combination with rapid warming is an efficient "conventional" vitrification in regard to survival rates and embryo development⁽⁴¹⁻⁴³⁾.

A new container for aseptic vitrification with simultaneous quick warming and removal of cryoprotectants was tested. Therefore, cooling and warming of oocytes and embryos was performed in cut standard straws (CSS) (Fig. 4). CSS were produced from standard insemination 0.25 ml (so called French) straws, which are cut at an angle of approximately 45°. Vitrification medium holding the embryo is placed to the cut part of the straw. After exposure in vitrification medium, one embryo with 0.25 to 0.75 µl of this medium is aspirated into the tip of pipettor and transferred to CSS (Fig. 4). Than CSS are loaded into 0.5 ml straws, which were closed at both sides and plunging into liquid nitrogen with a cooling speed of 600°C/min. For rapid warming, CSS is first removing from the bigger straw, which is still half submerging in liquid nitrogen, prior to plunging into sucrose solution (Fig. 4). This mode allows for the simultaneous removal of cryoprotectant and

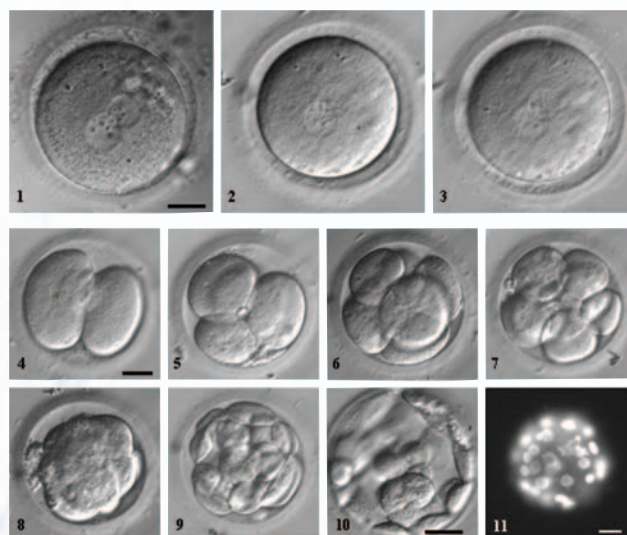


Figure 3. The same two-pronuclear embryo before vitrification (1), and after warming: for 5 min (same 2 and 3 with different focus), 6h (4), 18h (5), 30h (6), 42h (7), 66h (8), 78h (9), 96h (10), 96h stained by Hoechst 33342 (11). Bar= 30µm. rapid warming.

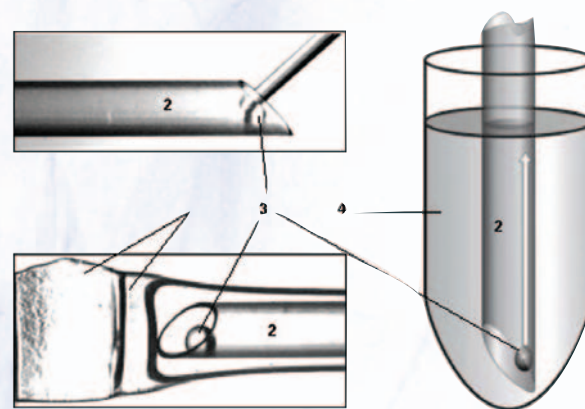


Figure 4. Photographs and scheme of warming using the Cut Standard Straw (CSS) container for vitrification: (1) closed 0.5 ml straw, (2) CSS, (3) vitrification medium with embryo, (4) tube with solution for warming and removal of cryoprotectant.

Short contact of cells with permeable cryoprotectant DMSO at decreased temperature.

The cryoprotectant DMSO is widely used for vitrification of human oocytes and embryos. It was reported that vitrification of blastocysts using ethylene glycol and DMSO resulted in 33.3% pregnancy rate and in the birth of a healthy baby⁽⁵³⁾. Later, in the same clinic two morula stage embryos were vitrified using the same protocol (with DMSO) and transferred, which resulted in the birth of two healthy twins⁽³⁴⁾. Until March 2005, 86 healthy babies were born after transfers of 332 embryos (birth rate 26%) after vitrification using DMSO (Yokota, personal communication).

The possibility and necessity to introduce DMSO to the vitrification medium for human reproductive cells is supported by data from Vanderzwalmen *et al.*⁽³⁹⁾ and Huang *et al.*⁽⁵⁴⁾, which have used this cryoprotectant for vitrification of blastocysts. The high pregnancy rate after warming of blastocysts (41% by Vanderzwalmen *et al.*⁽³⁹⁾ and 54% by Huang *et al.*⁽⁵⁴⁾ gives evidence about the efficiency of vitrification mediums composed in both cases by 20%DMSO + 20% ethylene glycol + sucrose + other compounds. Later the mentioned pregnancies resulted in the birth of healthy babies (Vanderzwalmen, personal communication about 98 healthy births including 28 twins per 414 warmed and transferred embryos; Huang and Lee, personal communication about 10 health births per 14 implantations with 3 spontaneous abortions and 1 reduction from triplet).

Also using DMSO for vitrification of oocytes was successful and resulted in high survival rate of warmed oocytes, ongoing clinical pregnancies⁽⁵⁵⁾ and birth of healthy babies after embryo transfers (Katayama, personal communication).

We specifically investigated the effect of DMSO on the vitrification process as well as its impact on further maturation in vitro of human GV-oocytes⁽⁴³⁾. Besides, the aim of our investigations was to test the method of aseptic vitrification of these oocytes in small straws, which are placed inside a hermetically closed container that guarantees a complete isolation of oocytes from liquid nitrogen and avoids potential contamination by pathogenic microorganisms. The presence of DMSO in vitrification medium, taking in respect to the duration of contact of this cryoprotectant with the cells, was studied. Cryopreservation solutions in this as well as in all other experiments were prepared in Dulbecco Phosphate Buffered Saline (DPBS) with 0.75M sucrose, 20% Serum Substitute Supplement and 10% polysaccharide Ficoll-70. Four experimental groups were formed (Fig. 5): “direct” vitrification with long exposure in ethylene glycol (20%) and DMSO (20%), aseptic vitrification without DMSO (when only 40% ethylene glycol was used), aseptic vitrification with long exposure in ethylene glycol (20%) and DMSO (20%), and aseptic vitrification with long exposure in ethylene glycol and short exposure in ethylene glycol (20%) and DMSO (20%). After warming and stepping-removal of cryoprotectants in sucrose, we found, that slow cooling / rapid warming can be also applied to human GV-oocytes. Using the aseptic technology maturation rate of GV-oocytes after vitrification in the range of 85% was observed. The short-term presence of DMSO at room temperature in the vitrification medium can improve the maturation rate of GV-oocytes and does not cause

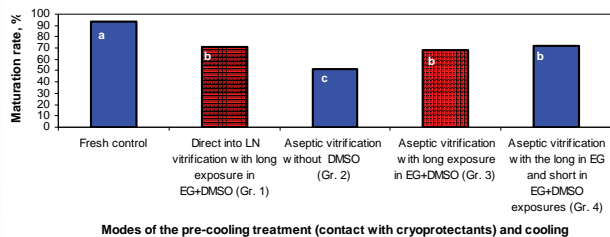


Figure 5. Effect of the pre-cooling treatment and cooling mode of GV oocytes on maturation rate and post-warm parthenogenesis.

LN-liquid nitrogen; DMSO-Dimethylsulphoxide; EG-Ethylene glycol;

Black columns indicate the groups, in which the cases of parthenogenesis were observed. Different superscripts indicated significant differences ($P < 0.05$).

spontaneous parthenogenesis⁽⁴³⁾.

In one experiment we studied the possibility to use a vitrification solution which is completely free of DMSO. One reason to do so was that DMSO was reported to affect the organisation of microfilaments in mouse oocytes⁽⁵⁶⁾ as well as to induce chromosomal abnormalities (increase in the rates of degeneration and digynic polyploid embryos) after cryopreservation of mouse oocytes in the presence of

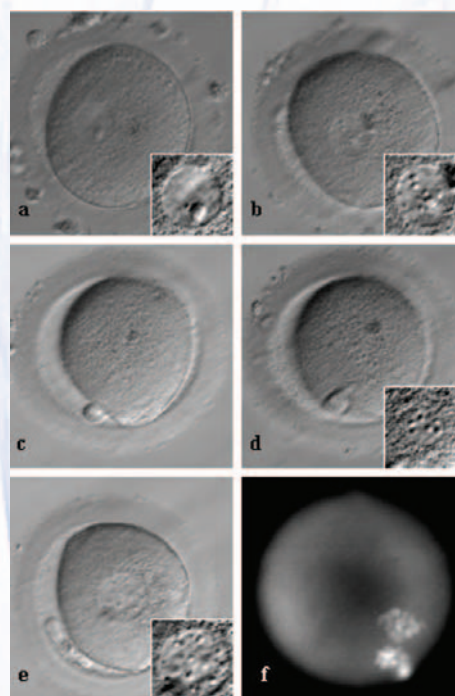


Figure 6. The same GV-oocyte vitrified with long (5 min) contact with DMSO at 37°C: (a) fresh before vitrification, (b) just after warming; after maturation: for 12 h (c), for 24 h (d), for 48 h (e), stained by Hoechst 33342 (f). Right down: magnified and contrasted imaged of germinal vesicle ((a) and (b)) and pronucleus ((d) and (e)).

DMSO⁽⁵⁷⁾.

However, in our experiments the absence of DMSO in the vitrification medium caused a significant decrease in maturation rates. On the other hand, a

5 min contact of oocytes with DMSO at 37°C was enough to cause spontaneous oocyte activation and parthenogenetic development. The protocol, which we found to be recommendable for use in medical practice is a compromise between the presence of DMSO in vitrification medium and parthenogenetic activation. Based on our results we propose to use 1) short (1 min) contact with DMSO which is only included in the last portion of vitrification medium, and 2) contact with DMSO at room temperature, that theoretically can decrease the negative effect on oocytes. The high maturation rates and the absence of parthenogenesis are a direct proof that this way of using DMSO (decreasing time and temperature of contact) is suitable for vitrification of human oocytes and embryos.

Use of aseptic technology for late human embryos and pronuclear embryos of other species

In most human in vitro fertilization programs embryo transfer is routinely performed on day 2 or 3. However, implantation rates are relatively low⁽⁵⁸⁾. One attempt to increase this rate might be the prolonged culture of human embryos up to the blastocyst stage and selection of the best embryos at that stage for transfer. To achieve this goal, sequential culture media were developed which fulfill the differential requirements of the embryo during early preimplantation development⁽⁵⁹⁾. Consequently, these media enabled blastocyst formation rates of up to 50% and due to extended culture those embryos with the best developmental potential were recognized more readily on day 5⁽⁶⁰⁾. Based on this approach, several studies reported higher implantation rate following transfer of selected blastocysts.

Comparative investigations on freezing and vitrification of human late blastocysts were performed. Liebermann and Tucker⁽⁶¹⁾ have evaluated implantation of day 5 and day 6 vitrified and conventionally (slowly) frozen blastocysts. Day 5 and day 6 blastocysts were vitrified or frozen and transferred after warming or thawing. In 508 transfer cycles, embryonic implantation rates for day 5 and day 6 vitrified blastocysts were 33% and 26%, respectively; after conventional freezing 30% and 28%, respectively.

Blastocysts with the laser opening of zona pellucida were the object of our investigations. This object is more difficult for cryopreservation than early blastocysts or blastocysts with intact zona pellucida by two reasons. It was reported that the survival rate of expanded blastocysts after vitrification is relatively low⁽⁶²⁾. These authors explain this fact by the presence of a big volume of water in the blastocoele, which in addition can be crystallised at cooling and these crystals can destroy the embryo. Also the laser opening of the zona pellucida decreases the cryostability of blastocysts and reports about vitrification of

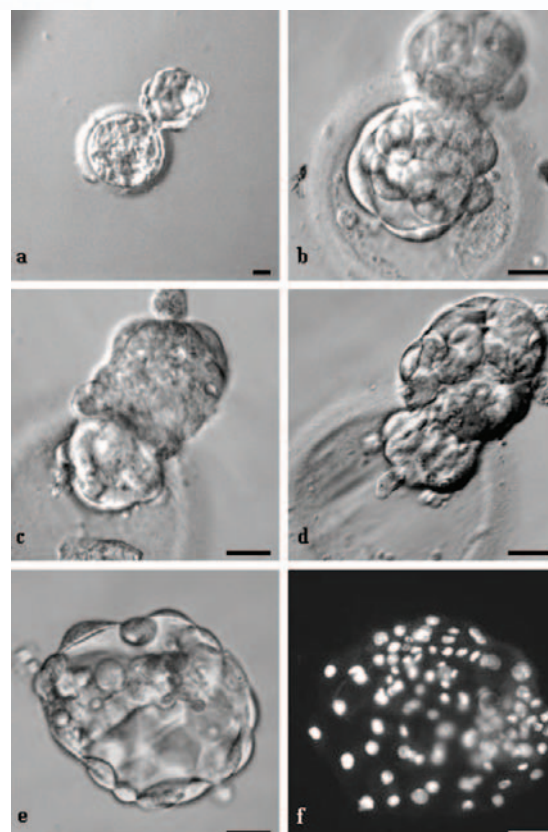


Figure 7. Six-day blastocysts from pronuclear embryo after polar body biopsy: fresh (a), after 30 sec exposure in 20% vitrification medium (b), 6 min after warming (c), 6 h after warming (d), and 12 h after warming (e) and (f) [stained by Hoechst 33342]. Bar= 30µm.

these types blastocysts are limited⁽⁶³⁾.

The aim of this study was to compare the viability of vitrified human blastocysts, using decreased concentrations of cryoprotectants, by direct submerging of cut standard straws (CSS) into liquid nitrogen versus vitrification by cooling of CSS loaded inside 0.5 ml straw (aseptic system). Six-day blastocysts were obtained after culture of pronuclear embryos and laser assisted hatching. These blastocysts were cryopreserved in CSS by vitrification in ethylene glycol + DMSO + 0.3 M sucrose. In Experiment 1, embryos were vitrified using vitrification medium with 20% + 20% and 15% + 15% permeable cryoprotectants. In Experiment 2, when vitrification medium included 15% ethylene glycol + 15% DMSO + sucrose, embryos were cooled rapidly and slowly (with isolation from liquid nitrogen). Embryos in both experiments (four groups) were rapidly thawed at a speed of 30,000 to 85,000°C/min using an identical protocol. Embryos of all experimental groups had the same rate of re-expansion after in vitro culture: from 80% to 85% (Fig. 7). It was noted, that vitrification of expanded blastocysts with decreased concentrations of permeable cryoprotectants and a complete isolation of embryos from liquid nitrogen in CSS is an efficient method. Described aseptic technology can be applied for pronuclear embryos of other

species including mouse.

Pronuclear mouse embryos attracted special interest for cryoinvestigations for two reasons. Firstly, this stage is used for production of transgenic mouse, which is a promising object for present and future biological investigations. Secondly, in some European countries, cryopreservation of zygotes after fusion of pronuclei or embryos is prohibited. For these two reasons, cryopreservation of mouse pronuclear embryos by direct plunging into liquid nitrogen is an interesting object for investigations.

The aim of our investigations was to test the method of cryopreservation of biopsied mouse pronuclear embryos in small straws, which are placed inside a hermetically closed container, guarantees a complete isolation of oocytes from liquid nitrogen and avoids potential contamination by pathogenic microorganisms. It was shown that the developmental potential of mouse pronuclear oocytes is not compromised if the thawing process involves rapid warming and simultaneous removal of cryoprotectants⁽⁴²⁾.

Aseptic vitrification can be applied for human pronuclear embryos, oocytes as well as for embryos of any developmental stage; the possibility of using of this technology for other mammalian species is promising.

Lately, several reports about vitrification of human embryos using cooling with isolation from liquid nitrogen were published. Kuwayama *et al.*⁽⁶⁴⁾ performed 16,000 human embryo cryopreservations and proved that vitrification is a good alternative of conventional freezing and resulted in high survival and in vitro developmental rates for pronuclear, multicellular and blastocysts stage human embryos. The authors described a vitrification mode that eliminates the risk of contamination of oocytes and embryos in liquid nitrogen⁽⁶⁴⁾. This method includes an isolation of vitrification medium from liquid nitrogen at cooling. Vanderzwalmen *et al.*⁽⁶⁵⁾ who proposed the method of small amount vitrification in hemi-straws, tested two modes of cooling of 3- and 5-days embryos using direct plunging into liquid nitrogen (non-aseptic conditions) and cooling with isolation from liquid nitrogen (aseptic conditions). The results show that post-thaw survival rates of morulas and blastocysts vitrified at a lower cooling rate inside a hermetic sealed straw are comparable to the control non-aseptic group.

Recently, it was shown that the previously reported method of vitrification using CryoloopTM can be used to vitrify and store mouse embryos without direct liquid nitrogen contact (during cooling and storage). When such vitrified embryos are warmed, they are capable of subsequent development compa-

table with non-vitrified embryos⁽⁶⁶⁾.

We believe that the investigations of aseptic vitrification were agitated by our results^(11-13, 26,27, 41,43)

Originality of human pronuclear embryos vs animals: intracellular lipids

As a rule, cryo-investigations in human embryos are based on successfully used protocols emerging from similar experiments performed on embryos from laboratory animals. Before it was possible to vitrify human pronuclear embryos, animal embryos at this stage had been successfully cryopreserved using the method of direct plunging into liquid nitrogen, and an effective protocol for vitrification of mouse pronuclear embryos was developed. These data proved useful in developing protocols for the vitrification of human pronuclear embryos.

Aseptic technology of vitrification of human oocytes and embryos can be successfully used for cryopreservation of mammalian oocytes of other species. However, it is necessary to take into account that human cells have their own peculiarities. One such attribute is intracellular lipids.

Intracellular lipids are a "stumbling block" for cryopreservation including vitrification. Data which demonstrated the role of these intracellular structures for cryopreservation were published⁽⁶⁷⁾. The method proposed involves polarization and removal of cytoplasmic lipids from oocytes or embryos before vitrification. Nagashima *et al.*⁽⁶⁷⁾ were the first to successfully grow embryos from GV-porcine oocytes that were vitrified following delipidization. Using this method the authors avoided a negative effect caused by cooled intracellular lipids. According to the data provided by the authors, removal of intracellular lipids does not lead to a worsening of further development of oocytes and embryos. Successful oocyte vitrification after removal of cytoplasmic lipids leads to the question of possible changes in the physio-chemical properties of cytoplasmic membrane lipids arising at low temperatures⁽⁶⁸⁾ being discussed as a significant cause of cryobiological problems for the terms of our experiments.

We believe that it is impossible to dismiss classic data about the role of intracellular lipids as energetic materials of oocytes and building materials for membranes of future embryos. The fact that the volume of mitochondria as well as lipid vesicles increases during oocyte development to M-II stage⁽⁶⁹⁾ indirectly confirms this point. Moreover, Sathanathan *et al.*⁽⁷⁰⁾ have shown that in the cell complex called "smooth endoplasmatic reticulum-lipid globules-mitochondria" reticulum-globules-mitochondria connections do exist. They have also shown that these connections may be damaged after oocyte

cooling or freezing.

In the overwhelming majority of work studying the effect of cooling on mammalian oocytes and embryos, a negative cryo-influence is explained in terms of the effect on cytoskeletal elements. For example, cooling of human oocytes causes depolymerization of cytoskeletal protein structures and most mouse oocytes cooled to 25°C for 10 min had an abnormal cytoskeleton⁽⁷¹⁾. After exposure to 4°C for 20 min, completely disassembled spindles were observed. This process of depolymerization is, however, reversible. Spindles of mouse oocytes returned to normal appearance after warming at 37°C for 60 min. Spindles of about half of human oocytes exposed to room temperature for 10 min returned to standard after 4 hours of cultivation at 37°C⁽⁷¹⁾. The negative effect of cooling is also explained as depolymerization of microtubules and microfilaments in other works performed on human oocytes. Bovine oocytes are also sensitive to decreasing temperatures⁽⁷²⁾. It has shown that 56% of oocytes exposed to 25°C and 90% of oocytes exposed to 4°C for 1 min had abnormal spindles.

Data on the sensitivity of porcine oocytes, which probably are a more “difficult” object for cryopreservation at low temperatures are limited. Didion *et al.*⁽⁷³⁾ who examined the viability of pig GV-oocytes following cooling or freezing by conventional methods found that the cumulus-intact GV-porcine oocytes do not survive cooling to temperatures at or below 15°C. As the authors noted, this was not surprising considering that porcine embryos from the 8-cell to blastocyst stage were killed when cooled below 15°C.

Publications on problems of mammalian oocyte and embryos cryopreservation contain information on the negative effects of low temperature including the cytoskeletal depolymerization by permeable cryoprotectants⁽⁷⁴⁾.

We suppose that the negative effect of cooling on oocytes may be explained by the effect of cooling lipids on cytoskeletal structures. Whilst performing our investigations on porcine oocytes, we found that following centrifugation, redistribution of lipids occurs within 48 hours of *in vitro* culture in oocytes not exposed to vitrification/warming (data not published). However, when polarized oocytes are vitrified/warmed, the lipid polarization is irreversible. This, in our opinion, suggests that the vitrification/warming process induces an alteration to the physio-chemical properties of intracellular lipids.

It is known that MII oocytes are more resistant to freeze damage than GV-stage oocytes. We consider that this may be due to differences in the properties

of cytoskeletal elements. One important difference is that the configuration of microtubules and microfilaments is different at these two stages of oocyte maturation. Cytoskeletal elements in GV-oocytes appear straight and rigid, while the appearance of microfilaments and microtubules in MII stage oocytes is undulating and flexible. Based on the hypothesis of a complex interaction between the lipid phase of cells and the elements of the cytoskeleton, hardening of these lipids might cause deformation and disruption of the cytoskeleton. In the case of the rigid GV-oocyte cytoskeleton this apparently results in permanent damage while in the more flexible MII-oocyte cytoskeleton, permanent damage is absent. Cytochalasins have a specific, reversible effect on cytoskeletal elements making them more flexible and less susceptible to the effect from cooled lipids. Testing this substance for vitrification of GV-porcine oocytes in combination with elevated temperature was effective⁽³⁵⁾. For the successful vitrification of GV-porcine oocytes⁽³⁵⁾, the following points may be important. An optimal protocol of vitrification must (1) prevent the alterations of the physio-chemical properties of cooled lipids; (2) avoid irreversible damage to the lipid globules membranes; (3) protect the cooling reticulum-lipids connection from destruction. Further investigations are needed to verify these assumptions.

It is known that bovine oocytes are to a considerable extent more cryostable than porcine ones. There is also information suggesting that the diameters of bovine and porcine intracellular lipid vesicles are different. The characteristics of the intracellular lipid granule membranes is also a topic of discussion.

We compared the ultra-structure of lipid droplets, and the effect of cooling on intracellular lipid vesicles of bovine and porcine GV-oocytes⁽⁷⁵⁾. It was shown that lipid droplets of bovine GV-oocytes have a homogeneous structure. The utilization of lipids takes place directly from these vesicles without formation of interim lipid compounds. In contrast, there are two kinds of lipid droplets in porcine GV-oocytes: “dark” and homogenous vesicles next to “gray” vesicles with electron-lucent streaks. Vesicles of each specific group are connected to each other. After a 12-hour culture, the formation of the cisternal smooth endoplasmic reticulum layer is always associated with “gray” lipid vesicles. This is evidence that during oogenesis lipolysis takes place in “gray” vesicles only. It is supposed that cytoplasmic lipolysis has two stages: “dark” vesicles change into a “gray” form followed by a utilization of these “gray” lipids. Furthermore both types of lipid droplets in porcine oocytes changed morphologically during cooling; they turned from a round into a spherical form with lucent streaks. Lipid droplets in bovine GV-oocytes revealed

no visible morphological changes after cooling⁽⁷⁵⁾. In order to compare intracellular lipids and the cryostability of ovine and human pronuclear embryos we have vitrified embryos of both species and evaluated the ultrastructure of intracellular lipids before and after vitrification. Cryopreservation of embryos was performed according to a method previously described for ovine GV-oocytes⁽²⁴⁾ with two different modes of removal of cryoprotectant: step-wise and direct rehydration. We noted, that in contrast to human pronuclear embryos where direct rehydration has a mortal effect after thawing, ovine pronuclear embryos after in vitro culture show a high developmental rates (31 to 34%). Fresh lipid droplets in both species are homogenous in structure. It was noted that after vitrification the intracellular lipids in cryopreserved human embryos underwent no visible morphological changes while distinct changes were observed in the lipid droplets of the sheep embryos. These alterations, attributable to the vitrification process, reflect changes in the physical and chemical properties of the lipids such as hardening. Figure 8 shows intracellular lipid droplets in both human and sheep pronuclear embryos and illustrate these differences of intracellular lipids.

The protocols used for vitrifying human pronuclear embryos are based on methods developed for animal embryos of this stage. In animal models, vitrification may sometimes be followed by effective post-thaw rehydration, without the need for stepwise dilution of permeable cryoprotectants in hypertonic solution. Thus, the vitrified and thawed cells are directly plunged into isotonic (culture) medium. In our investigations we used a vitrification/direct post-warm rehydration protocol that had been previously tested in our laboratory on GV-ovine oocytes⁽²⁴⁾ and, after slight modification, in rat early morulas, early blastocysts and expanded blastocysts⁽²⁵⁾. With the subsequent step-wise dilution of cryoprotectants, the same vitrification protocol was found to be highly efficient for human pronuclear embryos yet was completely ineffective when these human embryos were directly rehydrated after warming.

Thus it appears as if the ideal protocol of vitrification of pronuclear embryos with direct rehydration may have to compromise between the two conditions: maximal binding of intra-cellular water by permeable cryoprotectants, and the presence of minimal post-thaw quantities of these cryoprotectants in the cytoplasm. Prolonged exposure to the cryoprotectant seems to require extra-rehydration due to the increased quantity of intracellular cryoprotectant. In contrast, an insufficient amount of intracellular cryoprotectant during precooling exposure may result in insufficient binding of intracellular water. The

step-wise dilution procedure we used after warming indicates that both exposure times to the permeable cryoprotectant are sufficient for intracellular water binding. We, therefore, also tested these two time periods of 10 s or 1 min exposure in vitrification solution when the vitrified embryos were directly rehydrated after thawing. All attempts to vitrify human pronuclear oocytes with direct rehydration were unsuccessful.

We suggest that the specificity of human pronuclear embryos, reflected by their high sensitivity to osmotic processes, is related to the specificity of both intracellular lipids and cytoplasmic and organelle membranes. Lipids are the most cryo-labile intracellular compounds of oocytes and embryos. Indeed, the specific nature of intracellular lipids in pig oocytes makes them practically unsuitable for cryopreservation, particularly vitrification. Figure 8 shows the appearance of intracellular lipids of fresh human pronuclear embryos before and after vitrification in which no changes can be observed. We compared these lipids to those of pronuclear ovine embryos subjected to the same protocol which was used for human oocytes with direct rehydration in our previous investigations. These lipids of viable embryos showed ultrastructural changes after vitrification not noted in the human oocytes (Fig. 8). Bearing in mind the resistance of ovine pronuclear embryos to direct post-thaw rehydration, we were able to observe hardening (increase of density) and morphological alterations in the intracellular lipids of all cooled ovine oocytes. These alterations were absent in all human oocytes, which were clearly unable to tolerate direct rehydration. It may be assumed that within the same cell, the structure of intracellular and membrane lipids is the same. Given the detrimental role of lipids during cryopreservation, the lipid cryostability yet osmotic non-stability of pronuclear human embryos is

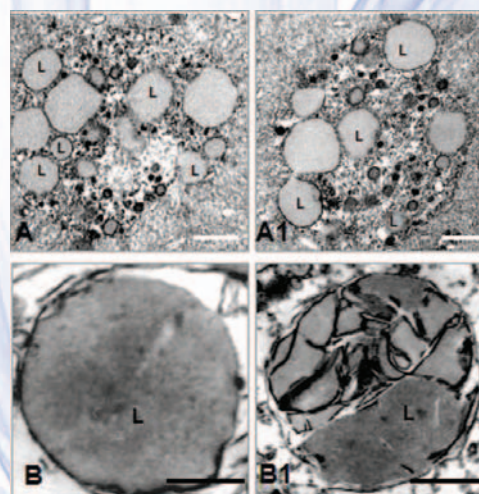


Figure 8. Electron micrograph of the intracellular lipid vesicles of fresh (A) and vitrified (A1) human and fresh (B) and vitrified (B1) ovine pronuclear oocytes. (L) lipid vesicle. Bar=0.5µm.

still far from being fully understood.

The direct post-thaw rehydration, induces lethal osmotic effects in human pronuclear oocytes but is successful for ovine oocytes. A correlation between the cryo-stability of mammalian oocytes and the ultrastructure of intracellular lipids is proposed for further investigations. Taking into account that the ultrastructure of intracellular lipids of laboratory and agricultural animals are different from human intracellular lipids we believe that using animal oocytes as a model for human oocytes in cryo-investigations is questionable.

In conclusion, aseptic vitrification can be applied for human pronuclear embryos, oocytes as well as for embryos of any developmental stage; the possibility of using of this technology for other mammalian species is promising.

REFERENCES

1. Porcu E, Fabbri R, Seracchioli, Ciotti PM, Magrini O, Flamigni C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril.* 1997;68:724-6.
2. Mohr LR, Trounson AO. Cryopreservation of human embryos. *Ann N Y Acad Sci.*1985;442:536-43.
3. Siebzehner?bl ER. Cryopreservation of gametes and cleavage stage embryos. *Hum Reprod.* 1989;4:105-10.
4. Al-Hasani S, Demirel L C, Sch?pper B, Bals-Pratsch, M., Nikolettos, N., Kupker *et al.* Pregnancies achieved after frozen-thawed pronuclear oocytes obtained by intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa extracted from frozen-thawed testicular tissues from non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod.* 1999;14: 2031-5.
5. Park SP, Kim EY, Oh JH, Nam HK, Lee KS, Park SY, *et al.* Ultra-rapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids. *Hum Reprod.* 2000;15:1787-90
6. Liebermann J, Tucker MJ, Graham JR, Han T, DavisA, Levy MJ. Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette. *Reprod Biomed Online.* 2002;4:148-52.
7. Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker M. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod.* 2002;67: 1671-80.
8. Liebermann J, Tucker MJ. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction.* 2002;124:483-9.
9. Selman HA, El-Danasouri I. Pregnancies derived from vitrified human zygotes. *Fertil Steril.* 2002;77:422-3.
10. Jelinkova L, Selman HA, Arav A, Strehler E, Reeka N, Sterzik K. Twin pregnancy after vitrification of 2-pronuclei human embryos. *Fertil Steril.* 2002;77:412-4.
11. Isachenko V, Selman H, Isachenko E, Montag M, Al-Danasuri I, Nawroth F. Modified vitrification of human pronuclear oocytes: efficacy and effect on ultrastructure. *Reprod Biomed Online.* 2003;7:211-6.
12. Isachenko V, Selman H, Isachenko E, Montag M, El-Danasouri I, Nawroth F. Effect of cryoprotectants on the ultrastructure of cooled human pronuclear oocytes. *Fertil Steril.* 2004;81:720-2.
13. Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Nawroth F, Dessole S, Van der Ven H. Developmental rate and ultrastructure of vitrified human pronuclear oocytes after step-wise versus direct rehydration. *Hum Reprod.* 2004;19:660-5.
14. Papis K, Shimizu M, Izaike Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology.* 2000;54:651-8.
15. Isachenko V, Isachenko E, Ostashko F, Grishchenko V. Ultra-rapid freezing of rat embryos with rapid dilution of permeable cryoprotectants. *Cryobiology.* 1997;34:157-64.
16. Isachenko V, Alabart JL, Isachenko E, Michelmann HW, Bezugly N. Ultra-rapid freezing and storage of rat embryos in an electric refrigerator at -130°C without liquid cryo-agents with ultra-short exposure in the freezing medium and direct rehydration after thawing. *CryoLetters.* 2000;21:13-8.
17. Sathananthan AH, Trounson A, Freemann L, Brady T. The effects of cooling human oocytes. *Hum Reprod.* 1988;3:968-77.
18. Fuku E, Xia L, Downey BR. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology.* 1995;32:139-56.
19. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature.* 1985;313:573-5.
20. Rall WF. Factor affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology.* 1987;24:387-402.
21. Rall WF, Reid DS, Polge C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical methods. *Cryobiology.* 1984;21:106-21.
22. Martino A, Songansen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod.* 1996;54:1059-69.
23. Vajta G, Kuwayama M, Holm P, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev.* 1998;51:53-8.
24. Isachenko V, Alabart JL, Nawroth F, Isachenko E, Vajta G and Folch J. The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? *CryoLetters.* 2001;22:157-62 .
25. Isachenko V, Folch J, Nawroth F, Krivokharchenko A, Vajta G, Dattena M, *et al.* Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identification protocol. *Theriogenology.* 2003;60:445-52.
26. Isachenko V, Selman H, Isachenko E, Montag M, El-Danasouri I, Nawroth F. Modified vitrification of human pronuclear oocytes: efficacy and effect on ultrastructure. *Reprod Biomed Online.* 2003;7:211-6.
27. Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Nawroth, Dessole S, Van der Ven H. Developmental rate and ultrastructure of vitrified human pronuclear oocytes after step-wise versus direct rehydration. *Hum Reprod.* 2004;19:660-5.
28. Szell A, Zhang J, Hudson R. Rapid cryopreservation of sheep embryos by direct transfer into liquid nitrogen vapour at -180°C. *Reprod Fertil Dev.* 1990;2:613-8.
29. Rall WF. Advances in the cryopreservation of embryos and prospects for application to the conservation of salmonid fishes. In: Cloud JG, Thorgaard GH, editors. *Genetic conservation of salmonid fishes.* New York: Plenum Press; 1993. p.137-58.
30. Rall WF, Wood MJ. High in vitro and in vivo survival of day 3 mouse embryos vitrified in a non-toxic solution of glycerol and albumin. *J Reprod Fertil.* 1994;101: 681-8.
31. Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod.* 2000;63:513-8.
32. Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen. Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Anim Reprod Sci.* 1996;45:191-200.
33. Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T *et al.* Wada S, Oka C, Kasai M *et al.* Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod.* 2003;18:384-91.
34. Yokota Y, Yokota H, Yokota M, Sato S, Araki Y. Birth of healthy twins from in vitro development of human refrozen embryos. *Fertil Steril.* 2001;76:1063-5.
35. Isachenko V, Perez-Sanchez F, Isachenko V, Grishchenko V, Soler C. Vitrification of GV-porcine oocytes with intact intracellular lipids: effect of the cryoprotectant saturation/dilution stepping, elevated temperature and cytoskeletal inhibitor. *Cryobiology* 1998;36:250-3.
36. Isachenko V, Gorbunov L, Isachenko E, Ostashko F, Bezugly N. Some physical and technological aspects of GV-porcine

- oocyte vitrification. *Cryobiology*. 1999;39:35 (Abstract).
37. Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes. *Nat Biotechnol*. 1999;17:1234-6.
 38. Lane M, Gardner DK. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Mol Reprod Dev*. 2001;58:342-7.
 39. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch, Standaert V, Bollen N, Rosendaal van E *et al*. Vitrification of human blastocysts with hemi-straw carrier: application of assisted hatching after thawing. *Hum Reprod*. 2003;18:1504-11.
 40. Son WY, Yoon SH, Yoon HJ, Lee SM, Lim JH. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. *Hum Reprod*. 2003; 18:137-9.
 41. Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Zaeva V, Krivokharchenko I, Shafei R, *et al*. Aseptic technology of vitrification of human pronuclear oocytes using open-pulled straws. *Hum Reprod*. 2005;20, 492-6.
 42. Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Van der Ven H. Vitrification of mouse pronuclear embryos after polar body biopsy without direct contact with liquid nitrogen. *Fertil Steril*. 2005;84:1011-6.
 43. Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Dessole S, Nawroth F, Van der Ven H. Aseptic vitrification of human germinal vesicle oocytes using dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant. *Fertil Steril*. 2006;85:741-7.
 44. Cremades N, Sousa M, Silva J, Viana P, Sousa S, Olivera C, *et al*. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. *Hum Reprod*. 2004;19:300-5.
 45. Kuleshova LL, Shaw JM. A strategy for rapid cooling of mouse embryos within a double straw to eliminate the risk of contamination during storage in liquid nitrogen. *Hum Reprod* 2000;15:2604-9.
 46. Isachenko V, Isachenko E, Katkov II, Montag M, Dessole S, Nawroth F, *et al*. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biol Reprod*. 2004;71:1167-73.
 47. Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology*. 2000;40:110-16.
 48. Tedder RS. Hepatitis B nucleotide sequence analysis: linking an outbreak of acute hepatitis B to contamination of a cryopreservation tank. *J Virol Methods*. 1996;60:818.
 49. Hawkins AE, Zuckerman MA, Briggs M, Gilson RJ, Goldstone AH, Brink NS *et al*. Hepatitis B nucleotide sequence analysis: linking an outbreak of acute hepatitis B to contamination of a cryopreservation tank. *J Virol Methods*. 1996;60:81-8.
 50. Charles GN, Sire DJ. Transmission of papova virus by cryotherapi applicator. *J Am Med Assoc*. 1971;218:1435-51. Schaffer TW, Everett J, Silver GH, Came PE. Biohazard potential: recovery of infectious virus from the liquid nitrogen of a virus repository. *Health Lab Sci*. 1976; 13:23-4.
 52. Jones SK, Darville JM. Transmission of virus-particles by cryo-therapy and multi-use caustic pencils: a problem to dermatologist? *Brit J Dermatol*. 1989;121:481-6.
 53. Yokota Y, Sato S, Yokota M, Araki Y. Birth of a healthy baby following vitrification of human blastocysts. *Fertil Steril*. 2001;75:1027-9.
 54. Huang CC, Lee TH, Chen SU, Chen HH, Cheng TC, Liu CH *et al*. Successful pregnancy following blastocyst cryopreservation using super-cooling ultra-rapid vitrification. *Hum Reprod*. 2005; 20:122-8.
 55. Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril*. 2003;80:223-4.
 56. Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH, Quick SJ. Dimethylsulphoxide affects the organisation of microfilaments in the mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*. 1990;26:227-35.
 57. Bouquet M, Selva J, Auroux M. Effect of cooling and equilibration in DMSO, and cryopreservation of mouse oocytes, on the rates of in vitro fertilization, development and chromosomal abnormalities. *Mol Reprod Dev*. 1995;40:110-5.
 58. Edwards RG, Brody SA. Principles and practice of assisted human reproduction. Philadelphia, Saunders, 1995. p. 425-518.
 59. Jones GM, Trounson AO, Gardner DK. Evolution and culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod*. 1998;13:169-77.
 60. Gardner DK. Development of serum-free media for the culture and transfer of human blastocysts. *Hum Reprod*. 1998;13:218-85.
 61. Liebermann J, Tucker MJ. Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil Steril*. 2006;86:20-6.
 62. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch, Standaert V, van Rosendaal E, Vandervorst M *et al*. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoele cavity before vitrification. *Hum Reprod*. 2002;17: 744-51.
 63. Zech NH, Lejeune B, Zech H, Vanderzwalmen P. Vitrification of hatching and hatched human blastocysts: effect of an opening in the zona pellucida before vitrification. *Reprod Biomed Online*. 2005;11:355-61.
 64. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*. 2005;11:608-14.
 65. Vanderzwalmen P, Lejeune A, Stecher N, Zech N, Delval A, Zech H. Survival of day 3 and day 5 embryos following vitrification in aseptic and non-aseptic conditions: a prospective randomised analysis. *Hum Reprod* 2005;84 (Suppl. 1):185 (Abstract).
 66. Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Vitrification of mouse pronuclear oocytes with no direct liquid nitrogen contact. *Reprod Biomed Online*. 2006;12:66-9
 67. Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman R J, Grupen CG, Nottle MB. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature*. 1995;374:416.
 68. Quinn P. Principles of membrane stability and phase behaviour under extreme conditions. *J Bioenerg Biomembr*. 1989;21:3-19.
 69. Dvorak M. Ultrastructure and quantitative analysis of mouse and human oocytes. In: Liss AR, editor. *Developments in Ultrastructure of Reproduction*. New York: Academic Press; 1989. p. 273-280.
 70. Sathananthan AH, Kirby C, Peura A, Trounson A. Mouse oocyte cooling. *J Assist Reprod Genet*. 1992;9:139-48.
 71. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril*. 1990;54:102-8.
 72. Aman RR, Parks JE. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol Reprod*. 1994; 50:103-10.
 73. Didion BA, Pom D, Martin MJ, Homanics GE, Markert CL. Observation on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *J Anim Sci*. 1990;68:2803-10.
 74. Johnson MH, Pickering SJ. The effect of dimethylsulfoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development*. 1987;100:313-24.
 75. Isachenko V, Michelmann HW, Alabart JL, Vazquez I, Isachenko E, Bezugly N, *et al*. Lipolyse and ultra-structural changes of an intracellular lipid vesicles after cooling of bovine and porcine GV-oocytes. *Anat Histol Embryol*. 2001;30:333-338.

BlastAssist[®] System

– single blastocyst transfer. More effective. Fewer complications.

Life's beginning in safe hands

The embryo's requirements change during the early developmental stages. When culturing blastocysts, the in vitro environment must mimic these changes to allow optimal growth.

BlastAssist[®] System is the leading sequential media for dedicated blastocyst culture - ensuring good quality embryos and maximising the likelihood of a successful transfer and pregnancy.

A study by The Hawaii Center for Reproductive Medicine and Surgery has recently confirmed that BlastAssist[®] System shows blastocyst development clearly superior to other sequential media. The BlastAssist[®] System provides more blastocysts for single embryo transfer and cryopreservation.

BlastAssist[®] System is a result of our innovative focus within Assisted Reproduction Technology. We call it Fresh Thinking.

We strive to communicate and improve skills and knowhow within the ART community - to ensure life's beginning in safe hands.

**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

 **MediCult**
Innovation with Care



SPORTEX[®]
CONDOMS

Fire: Лубрикиран релефен презерватив за силни усещания.

Light: Супертънък, но здрав лубрикиран презерватив за чувствени удоволствия.

Lady's choice: Предпочитана от дамите комбинация от презервативи: супертънък, релефен и черен.

Exotic: Лубрикирани презервативи с три различни аромата: банан, ягода и ванилия.

Power: Лубрикиран презерватив на точки за екстремни удоволствия.

Extra: Спермицидно лубрикиран презерватив за по-голяма сигурност (с NONOXINOL 9).

Exclusive: Ултра тънък, спермицидно лубрикиран презерватив (с NONOXINOL 9) за безопасно и неосезаемо присъствие.

Standard: Висококачествен лубрикиран презерватив за естествени усещания.

Chic: Лубрикиран черен презерватив за специални случаи.

Orgazm: Нов спираловиден презерватив. Мъжете го описват като единствения презерватив, с който се чувстват напълно свободни.

НАПРАВИ СВОЯ ИЗБОР ПРИ НАС



За контакти: Крос-М ООД, тел./факс: 02/9366506, e-mail: office@sportex-condoms.com

ЕПИГЕНЕТИЧНО МОДЕЛИРАНЕ НА ЕМБРИОНАЛНОТО И ПОСТНАТАЛНОТО РАЗВИТИЕ

Г. Георгиев, Р. Конакчиева

Институт по Биология и Имунология на Размножаването, БАН

EPIGENETIC REMODELING OF THE EMBRYONIC AND POSTNATAL DEVELOPMENT

G. Georgiev, R. Konakchieva

Institute of Biology and Immunology of Reproduction, Bulgarian Academy of Sciences

Резюме: Терминът “епигенетика” се използва приблизително от едно столетие във връзка с промените във функциите на гените, които не са резултат само от изменения в генната последователност. Днес при редица злокачествени заболявания, когнитивни и респираторни дисфункции, психо-соматични, имунологични и др. нарушения се установяват доказателства за промени, свързващи ги с епигенетични механизми. Като известни или предполагаеми инициращи епигенетичния процес вещества се включват някои тежки метали, пестициди, дизеловите горива, тютюнопушенето, редица хормони, радиоактивност, инфекции, режими на хранене и др. Установени са различни типове епигенетични процеси, основните от които представляват метилиране, ацетилиране, фосфорилиране и убиквитинилиране на природни биологични макромолекули. Епигенетичните процеси протичат естествено и са от значение за много функции на организмите, но тяхното неадекватно проявяване може да предизвика съществени здравословни и поведенчески проблеми. Разшифроването на молекулните механизми на специфични епигенетични модели би било изключително полезно при създаването на нови диагностично-прогностични подходи за лечение на редица заболявания при хората, създаване на здравословни хранителни режими и др.

Abstract: The term “epigenetics” has been introduced for nearly a century to describe changes in gene function emerging by more than just changes in gene sequence. Today, a wide variety of malignant illnesses, cognitive and respiratory dysfunction, psycho-somatic, immunological and other disturbances display evidence linking them to epigenetic mechanisms. Epigenetic processes can be triggered by heavy metals, pesticides, diesel fuels, tobacco smoke, many hormones, radioactivity, infections and dietary regimen. Different types of epigenetic processes have been identified, most commonly including methylation, acetylation, phosphorylation and ubiquitylation of biomacromolecules. Epigenetic processes are natural and essential to many organism functions, but if they occur improperly, they can cause detrimental effects to health and behavior. Deciphering of the molecular mechanisms of specific epigenetic patterns might be of great diagnostic and prognostic value by the treatment of human diseases, by the establishment of healthy dietary regimens and quality of life.

По време на развитието на бозайниците, клетките в състава на тъканите се диференцират, като променят профила на генната си експресия в отговор на стимули или сигнали от външната среда. Дълго след като тези външни стимули изчезнат, механизмите на “клетъчната памет” им позволяват да запомнят избраната от тях съдба за много клетъчни деления напред. Отдавна се предполага, че хроматинът играе основна роля в тези механизми, но как епигенетичната памет, която се определя от унаследените групи активни и неактивни гени, се предава на дъщерните клетки не е ясно.

Регулиране на генната експресия от епигенетични промени

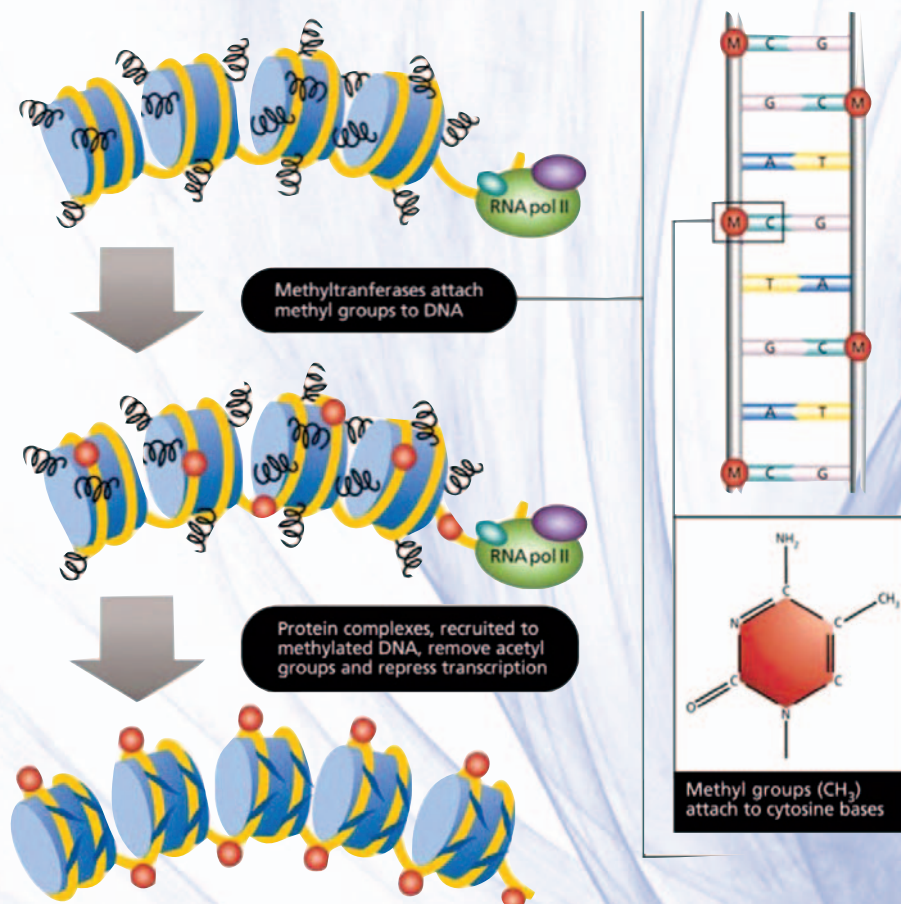
Първоначално като епигенетични се определят процесите от развитието, при които генотипът формира фенотипа. Днес епигенетиката може да се дефинира като унаследяване на информацията във основа нивото на активност на генна експресия, а не толкова на генната структура. Всички тъкани при човека например, съдържат едни и същи 30 000 гена, но въпреки това, в определена тъкан и в даден момент, само няколко от тези гени се експресират, което се дължи на епигенетичния код.

Епигенетичният код обхваща няколко нива на взаимно свързани и взаимно зависими кодове: код на статус на метилиране на ДНК, хистонови код (метиране, ацетиране и фосфорилиране на хистоновите белтъци, свързани с ДНК) и кода на ко-регулаторните транскрипционни фактори. Тези кодове определят и насочват правилното реконструиране на хроматина⁽¹⁾.

Специфичните особености на епигенетичното унаследяване обуславят достъпа на транскрипционни фактори до хроматина, разпознаването от тези фактори на гени, които ще се експресират (в различна степен) и на гени, чиято активност предстои да бъде заглушена временно или постоянно. Епигенетичните белези могат да се предават по време на митотичния, а в някои случаи и на мейотичния цикъл, което води до стабилно унаследяване на регулаторните характеристики. Преходни хранителни стимули по време на критични фази от онтогенетичното развитие могат да имат дългосрочно влияние върху експресията на редица гени чрез намеса в епигенетичните механизми и промяна в конформацията на хроматина и достъпа му до транскрипционни фактори⁽²⁾.

Може би най-добре проученият епигенетичен процес, отчасти поради това че е най-достъпен за изследване с налични технологии е процесът на метилиране на ДНК. Той представлява добавяне или отстраняване на метилови групи (CH₃) на места, където в молекулата на ДНК следват цитозинови остатъци. През 1983 год. за първи път е било установено метилиране на ДНК при хора, болни от рак и от този момент досега този феномен е наблюдаван във връзка с много болести и здравословни състояния при хората (Фиг. 1).

Другият значим процес, свързан с епигенезата е модифицирането на хроматина. Хроматинът представлява комплекс от протеини (хистони) и ДНК, който е добре пакетирани, за да може да асоциира в ядрото. Комплексът може да бъде модифициран от вещества като ацетилови групи (процес на ацетиране), ензими и някои форми на РНК като микро-РНК и нискомолекулни интерфериращи РНК (iRNA). Това модифициране променя хроматиновата структура и повлиява генната експресия. Като цяло, здраво пакетираният хроматин проявява неактивност за транскрипция, докато отвореният хроматин е функционален или подлежи на експресия.



Фигура 1. Метилиране на ДНК - механизъм за епигенетично модифициране

Едно важно последствие от тези процеси е копирането (отпечатване, *imprinting*). В генетиката, импринтингът описва състояние в което един или двата алела на една типична гена двойка е заглушен (инактивиран) чрез епигенетичен процес на ДНК метилиране или ацетилиране на хистони. Това се превръща в проблем, ако съответният алел е повреден или съдържа вариант, който увеличава податливостта на организма към микроби, токсични агенти или други вредни субстанции. Импринтингът като феномен за първи път е бил установен в растителни зародиши през 1910 год., а при бозайници потвърден през 1991 година.

В резултат на интензивни проучвания е установено, че около 80 човешки гена могат да бъдат инактивирани чрез импринтинг, въпреки че този брой се оспорва, тъй като експерименталните доказателства не винаги са достатъчно коректни. Този приблизителен брой вероятно няма да нараства съществено занапред според някои изследователи. Според други оценки на изследванията на геномите на бозайниците, при мишки са възможни до 600 такива гена, което също е възможно и за човека, въпреки че припокриването на заглушените гени при човек и гризачи е само около 35%.

Връзка на епигенетиката със заболявания при бозайниците

Вече е установено, че нарушеният баланс на епигенетичната мрежа може да доведе до някои сериозни заболявания, сред които рак, синдроми, включващи нестабилност на хромозомите, автоимунни заболявания, поведенчески и ендокринни нарушения, умствено изоставане. Значението на епигенетичните промени при туморогенезата се изследва интензивно през последните две десетилетия и се счита като един

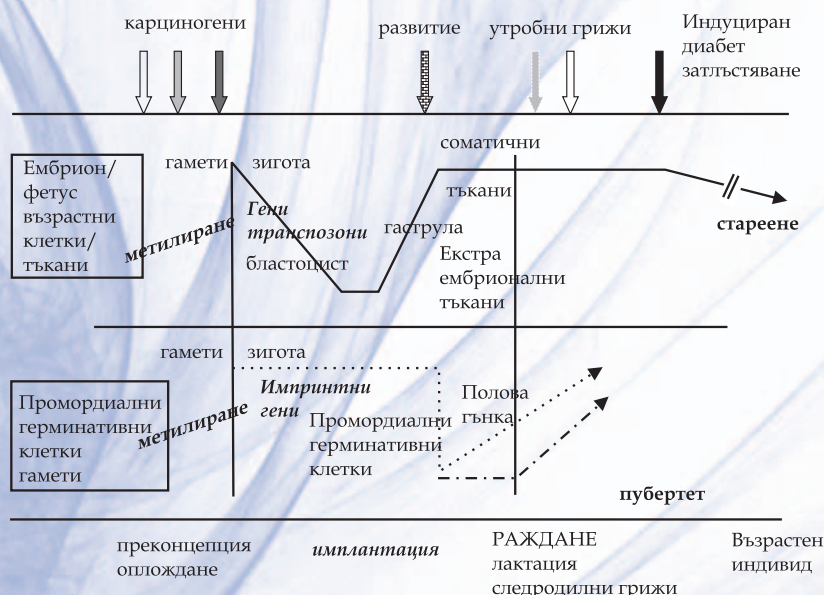
от основните механизми за предразположеност и развитие на ракови заболявания. Връзката между епигенетичното унаследяване и други патолофизиологични механизми при разпространени заболявания, като метаболитния синдром например, не е толкова ясна (3). Вече са налице данни в подкрепа на хипотезата, че пациенти с метаболитен синдром са били подложени на неправилно епигенетично програмиране по време на ембрионалното / постнаталното развитие заради неправилно хранене на майките и смущения в техния метаболизъм. Възможно е и унаследяване на тези епигенетични промени в следващи поколения.

Епигенетично програмиране по време на ембрионалното и постнаталното развитие

Тъканите и органите се изграждат в отговор на прецизни генетични и епигенетични програми чрез процесите на пролиферация, диференциация и апоптоза. Предполага се, че нарушеният баланс между храненето (качествено и количествено), метаболитните и конкретните изисквания на специфичните клетъчните процеси в пространствено-времеви граници, може да доведе до:

1. дефекти в структурното и функционалното развитие, а дори и отсъствие на определени специализирани клетъчни типове, което води до безизходна ситуация заради необратими процеси на диференциация и органогенеза,
2. промени в хомеостатични процеси, свързани с променливи и потенциално обратими епигенетични модификации.

Ефектът от дебалансирания хранителен режим при животни (плътх, мишка и овца) върху епигенетичното програмиране през индивидуалното развитие, по време на конкретни



Фигура 2. Влияние на хранителните съставки или промени в хранителния режим върху репрограмиранието чрез метилиране на ДНК по време на ранното развитие и с възрастта.

периоди и при възможността от наследяване в следващото поколение, е добре описан (фиг. 2) ⁽⁴⁾.

Необратими процеси на диференциация и органогенеза

При експерименти с лабораторни гризачи е установено, че ограничаване на белтъчния прием през бременността повишава нивото на апоптоза в панкреаса при следващите поколения. Това води до понижено количество панкреатични β -клетки и нарушава развитието на ендокринната част на панкреаса, което се унаследява ⁽⁵⁾. По подобен начин, богат на въглехидрати режим на хранене незабавно предизвиква хиперинсулинемия, която се запазва с възрастта без да са необходими повече стимули. Освен това, след като този метаболитен отпечатък (imprint) бъде оставен, се навлиза в порочен кръг, тъй като женските плъхове предават спонтанно фенотипа на поколението си. Тези примери показват, че един и същ ефект може да бъде породен от коренно различни причини.

Определени вмешателства в хранителния режим, които намаляват кръвоснабдяването на плода през плацентата и спират растежа му, имат същите последствия в дългосрочен план. По подобен начин, при деца и възрастни, недохранването или преяждането може да предопределят насоките на липидния метаболизъм и други метаболитни системи на тези лица по време на живота им. При възрастни индивиди, промени в метилирането по време на диференциация са наблюдавани само при няколко гена. Две изследвания показват строга връзка между деметилирането на лептиновия промотор и пре-адипоцитната диференциация на адипоцити ^(6, 7). Ясно е, че същите механизми трябва да ваят за всички гени, участващи в развитието и диференциацията. Акумулирането на грешки при метилирането на ДНК с възрастта например ⁽⁸⁾, може да спомогне за развитието на диабет тип-2 чрез намален отговор на гени, чиято експресия трябва да бъде променена в отговор на бързо изменящите се нива на глюкоза в периферното кръвообръщение. Освен това, заради тяхната наследствена лабилност, генетично детерминирани епигенетични механизми са податливи на влияния от външната среда или промени в хранителния режим ⁽⁴⁾.

Епигенетично програмиране на поведението

Конкретно епигенетично състояние може да бъде постигнато чрез програмиране на поведението. Неотдавна Meaney и сътр. доказаха ⁽⁹⁾, че доброто обгрижване на малките плъхове от майките им е свързано с по-добър отговор към стрес при техните поколения в напреднала възраст. Това

поведение на майките променя епигенетичните характеристики при техните поколения на ниво промотора на гена за глюкокортикоидния рецептор в хипокампуса. Повечето грижи от страна на майките предизвикват деметилиране на промотора на гена за глюкокортикоидния рецептор (GR), което е свързано с по-високи нива на експресия на този ген. Тези епигенетични промени в метилирането на ДНК и ацетилирането на хистоните се появяват през първата седмица от живота и се запазват с възрастта. Това неонатално програмиране може да бъде променено чрез изменение на епигенетичния профил на гена за глюкокортикоидния рецептор. Директно добавяне на инхибитор на хистоновата ацетилаза, трихостатин А, води до заличаване на разликите между групите по отношение ацетилирането на хистони, метилирането на ДНК, свързането на NGFI-A (Nerve Growth Factor Inducible Protein A), експресията на GR, както и отговора на хипоталамо-хипофизо-адреналната система на стрес, което предполага наличието на връзка между епигенетичното състояние, експресията на GR и влиянието на майката върху отговора към стрес в напреднала възраст ⁽⁹⁾.

Циркадно епигенетично програмиране

Експресията на гените в циркадния цикъл се модулира чрез молекулни сигнали от циркадните ритми, чрез сигнали от храната, както и чрез цялото разнообразие от външни стимули. Съпътстващите епигенетични промени са нестабилни и обратими в ежедневието: те са задължително случайни и водят до възникването на "циркаден хранителен епифенотип". Независимо от това, епигенетичните промени не винаги са обратими. Доказано е, че с възрастта се натрупват случайни стохастични грешки в метилирането на ДНК, като хипометилиране, свързани с ниски нива на основния донор на метилови групи, S-аденозилметионина. Те вероятно са отговорни за по-голямата честота на метаболитния синдром при хора в напреднала възраст ⁽⁸⁾. Освен това метаболизмът на метиловите групи може да бъде повлиян от хранителния режим, телесното тегло и фактори на средата, което води до случайно хипометилиране на ДНК при пациенти с диабет ⁽¹⁰⁾. Хипометилиране в генома се наблюдава не само при злокачествени заболявания, но също и при напреднали атеросклеротични лезии. Нови изследвания при мишки ясно показват, че отклонения в епигенетичното унаследяване могат да се наблюдават при генетично предразположени към атеросклероза мишки доста преди появата на хистологично

установими васкуларни лезии. Освен това тези промени могат да бъдат предизвикани и от атерогенетичен хранителен режим при мишки и хора⁽¹¹⁾.

Установено е, че както и при раковите заболявания, хиперметирането на определени места възниква и при артеросклерозата. Генът за естрогеновия рецептор-алфа (ER- α) се метилира в по-голяма степен при атеромии, отколкото при нормална аорта и в гладкомускулни клетки *in vitro* по време на фенотипно превключване⁽¹²⁾. В резултат на бързо разширяващи се изследвания, ранните епигенетични промени са описани при артеросклероза, животни с хранителен режим, богат на мазнини, диабет тип-2 и с възрастта^(8, 10, 13). Въпреки това, епигенетичните изменения в основата на гранични психо-соматични и ендокринни заболявания, като метаболитния синдром например, все още не са изследвани и описанието на епигенетичните ефекти при различни условия и възрастови периоди едва сега започва. В резултат на определяне последователността на човешкия геном е било установено, че транспозони, които съставляват около 35-40% от генома, се намират в около 4% от човешките гени⁽¹⁴⁾. Би било интересно да се докаже дали тези гени участват в контрола на енергийната хомеостаза. С изключение на къс период на общо деметилиране на ДНК в ранните етапи на ембрионалното развитие при бозайниците, транспозоните нормално се поддържат неактивни чрез метилиране на промоторни CpG последователности.

Счита се, че ретранспозоните се поддържат в предимно метилирано състояние, за да се предотвратят ретранспозонни събития, които могат да станат причина за вредни мутации и канцерогенеза. Въпреки това, някои транспозони, като мишият IAP (intracisternal A particle) ретранспозон, който се изплъзва от това епигенетично заглушаване, може да интерферира с експресията на съседни гени по различни начини. До този момент не са представени примери за човешки транспозонни елементи, подобни на IAP последователностите, които да са в състояние да устоят на деметилиране по време на преимплантацията, но тези възможности са предмет на активни изследвания.

Каквито и да са гените или последователностите, които участват в епигенетичното кодиране, тяхното прецизно разшифроване би допринесло да се оцени потенциалната обратимост на дадената епигенетична промяна. Веднъж след като бъдат разгадани специфичните модели,

отговарящи на "променлив" и "заклучен" статус, те биха били използвани и изключително полезни при диагностично-прогностични методи. Те могат да се превърнат в нов обект за създаване на диетични режими и фармакологични средства за предотвратяване или преодоляване заглушаването активността на определени гени, които в конкретни клинични случаи са свързани с нечувствителност към лечение.

Литература

1. Spotswood HT, Turner BM. An increasingly complex code; 2002, *J Clin Invest*, 110: 577-582
2. Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that leads to chronic disease; 1999, *Am J Clin Nutr*, 69: 179-197
3. Egger G, Liang G, Aparicio A et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy; 2004, *Nature*, 429: 457-463
4. Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes and susceptibility to adult chronic disease; 2004, *Nutrition*, 20: 63-68
5. Blondaeu B, Avril L, Duchene B et al. Endocrine pancreas development is altered in fetuses from rats previously showing intra-uterine growth retardation in response to malnutrition; 2002, *Diabetologia*, 45: 394-401
6. Melzner I, Scott V, Dorsch K et al. Leptin gene expression in human preadipocytes is switched on by maturation-induced demethylation of distinct CpGs in the proximal promoter; 2002, *J Biol Chem*; 277: 45420-45427
7. Yokomori N, Tawata M, Onaya T. DNA demethylation modulates mouse leptin promoter activity during differentiation of 3T3-L1 cells; *Diabetologia*, 45: 140-148
8. Issa IL. Epigenetic variation and human disease; 2002, *J Nutr*, 132: 2388 S-2392 S
9. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA et al. Epigenetic programming by maternal behaviour; 2004, *Nat Neurosci*, 7: 847-854
10. Maiers S, Olek A. Diabetes: a candidate disease for efficient DNA profiling; 2002, *J Nutr*, 132: 2440 S - 2443 S
11. Hiltinen MO, Turunen MP, Hakkinen TP et al. DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions; 2002, *Vasc Med*, 7: 5-11
12. Ying AK, Hassanain HH, Roos CM et al. Methylation of the ER-alpha gene promoter is selectively increased in proliferating human aortic smooth muscle cells; 2000, *Cardiovasc Res* 46: 172-179
13. Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC et al. Methylation of the ER-alpha gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system; 1999, *Cardiovasc Res* 43: 985-991.
14. International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome; 2001, *Nature*, 409: 860-921.

Адрес за кореспонденция:
Росица Конакчиева
ИБИР "Акад. К. Братанов" - БАН
бул. "Цариградско шосе" 73
1113 София
e-mail: r_konakchieva@abv.bg

РЕГУЛАЦИЯ НА ИМПЛАНТАЦИЯТА И БИОМАРКЕРИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА МАТОЧНАТА РЕЦЕПТИВНОСТ

Д. Гуленова, Г. Николов
МЦ "РепроБиоМед" ООД, София

REGULATION OF IMPLANTATION AND BIOMARKERS FOR ENDOMETRIAL RECEPTIVENESS

D. Gulenova, G. Nikolov
MC "ReproBioMed" Ltd, Sofia

Резюме: При 37% от инфертилните двойки се установява необяснен стерилитет, който в значителна степен вероятно се дължи на проблеми с имплантацията. Това е особено валидно при жени с рекурентен неуспех след АРТ. През последното десетилетие редица ендометриални биомаркери дават информация за евентуални дефекти в процеса на имплантация. Измежду по-важните можем да споменем - стероидните и пептидните хормони, мембранно свързаните протеини и муцини, секреторни протеини, растежни фактори и цитокини, структурните промени и маточния кръвоток на ниво ендометриум и други. При всички случаи, използването на такива маркери би спомогнало за разгадаване механизма на имплантация, за диференциране на жените с повишен риск от неуспешна ембрионална имплантация, за изследване ефективността на различни методи за лечение на инфертилитета, а също и за развитието на нови и по-сигурни методи на контрацепция, насочени към ендометриалната рецептивност.

Abstract: In 37% of all couples with difficulties to conceive unexplained infertility is assumed, in many cases due to implantation compromise, especially in women with recurrent ART failure. Information from a variety of endometrial receptivity biomarkers has been available in the past decade. The most important markers are - steroid and peptide hormones, membrane attached proteins and mucines, secreted proteins, growth factors and cytokines, endometrial structural transformations and blood-flow etc. In any case, the usage of such biomarkers can help the process of understanding the mechanism of implantation, discrimination of women with high risk for compromised implantation, testing the efficacy of different methods for treatment, as well as the development of new methods for endometrial receptivity contraception.

Въведение

Въпреки напредъка в областта на съвременната репродуктивна медицина, изненадващо голям брой двойки по света имат проблеми със забременяването или с износването на плода, като причините за това могат да бъдат от различно естество.

Идиопатичният инфертилитет е диагноза при повече от 37% от двойките, като при част от тях днес проблемът се обяснява с дефекти в процеса на имплантация и намалената или пълната липса на маточна рецептивност, нещо, което е често срещано при жени, претърпели поредно неуспешно ин витро оплождане.

Изследването на ембрионалната имплантация и дефектите на маточната рецептивност са област на бързо развитие и същевременно на големи

дебати. Навлизането на ендометриалните биомаркери като метод за изследване на евентуалните дефекти в имплантацията, е сериозна стъпка напред в областта на репродуктивната медицина. Използването на такива маркери би спомогнало за разгадаване механизма на имплантация, за диференциране на жените с повишен риск от неуспешна ембрионална имплантация, за изследване ефективността на различни методи за лечение на инфертилитета, а също и за развитието на нови и по-сигурни методи на контрацепция, насочени към ендометриалната рецептивност.

Имплантация

Ембрионалната имплантация е процес, при който ембрионът се ориентира и прикрепва към маточната лигавица, като в последствие я инвазира. За осъществяването му е необходимо

да са налице: рецептивен ендометриум, функционално нормален бластоцист и адекватна комуникация между тях.

Ендометриумът е уникален по структура и функции и е една от тъканите, към които ембрионът не би се прикрепил и съответно имплантирал, освен в много краткия период от време на т. нар. "имплантационен прозорец" в дните 20-24 от месечния цикъл⁽¹⁾. За първи път този термин е използван от Finn и Martin (1974).

От направено изследване върху пациентки е установено, че прикрепени към маточната лигавица ембриони са открити при жени, намиращи се в секреторна фаза на ден 21^{??} или повече от цикъла, докато в материали получени в по-ранни етапи (20^{??} ден или по-рано) са открити ембриони, все още плуващи в маточната кухина или във Фалопиевите тръби; следователно имплантацията настъпва на 5^{??} - 6^{??} ден от развитието на ембриона. При овоцитна донация ембриони, трансферирани на 2^{??}- 3^{??} ден от развитието си и преди 20^{??} ден от овулацията дават най-високи нива на имплантация⁽²⁾.

При комуникацията между бластоциста и майчиния ендометриум участват редица макромолекули - хормони, цитокини, интегрини, ензими и др.; следва да е налице директен контакт между ендометриалния епител (ЕЕ) и трофектодермата (ТЕ), като през инвазионния период ембрионалният трофобласт преминава през базалната мембрана, ендометриалната строма и достига до маточните кръвоносни съдове.

Първият опит за оценка на ендометриалния капацитет за имплантация се основава на хистологичните промени по време на отделните фази от развитието на лигавицата означени като "endometrial dating", който доведе до откриването на т. нар. недостатъчност в лутеалната фаза (LPD). Диагностицирането на LPD говори за наличие на хетерогенни условия, които са свързани с субфертилитет и се смята че са резултат от неадекватна хормонална стимулация или ендометриален отговор⁽³⁾. Тези все още спорни условия често се откриват при двойки с инфертилитет, като може да се сметне, че те са най-честата причина за повтаряща се загуба на бременността.

Хормонална регулация на имплантацията

Маточната лигавица е специализирана, хормонално регулирана тъкан, която при човека и приматите през по-голямата част от менструалния цикъл е неадхезивна за ембриони.

Развитието на нейната рецептивност се направлява от овариалните стероиди - естрадиол и прогестерон, като ендометриумът претърпява значими промени от пролиферативната към секреторната фаза на цикъла.

Естрадиолът е митогенен хормон, който води до пролиферация на ендометриума и експресия на различни протеини, в това число рецептори за естрадиол и прогестерон. След овулацията **прогестронът** трансформира ендометриума в секреторна фаза, която служи за изхранването на ранния бластоцист и го подготвя за прикрепване и имплантация. Луминалният ендометриален епител (LEE) се превръща в рецептивен основно поради наличието на прогестерон след подходящо 17 β -естрадиолно инициране⁽⁴⁾. Установено е, че прилагането на прогестеронов антагонист или Е₂ антисерум по време на предимплантационния период води до нарушаване на ендометриалната рецептивност при приматите.

Тази трансформация е свързана с регулирана експресия на специфични гени, които спомагат или лимитират способността на бластоциста и респективно трофобласта да се имплантира в маточната лигавица. Много от продуктите на тези гени взаимодействат с комплементарни ембрионални белтъци. Общият генетичен профил, получен след използването на методика с високо-плътностни олигонуклеотидни чипове показва участието на 323 различни гена с най-малко двустепенна "up regulation" и 370 гена с най-малко двустепенна "down regulation", проявяващи активност от ранна до средна лутеална фаза и сходен брой гени, експресирани се между пролиферативна и секреторната фаза на ендометриума⁽⁵⁾.

Стероидите са способни на саморегулация чрез ядрените си рецептори, като Е₂ действа посредством два естрогенови рецептора - ER и ER α , а прогестерона чрез прогестеронов рецептор (PR). ER и PR проявяват максимална експресия в епитела и стромата по време на късната пролиферативна и ранната секреторна фаза⁽⁶⁾. И стромата и епитела експресират PR, като Е₂ индуцира изявата на PR в стромата и клетките на жлезистия епител и редуцира изявата на PR в луминалният епител⁽⁷⁾. ER е силно експресиран в LEE, а ER α е модулатор на ER β -посредствената генна транскрипция и е отговорен за селективната даунрегулация на PR в LEE. Този механизъм, чрез който прогестероновият сигнал се "изключва" може да бъде разгледан като саморегулация за завършване на рецептивния статус.

Ембрионът от своя страна има значение в индуцирането на рецептивния статус - роля, която е демонстрирана при нечовекоподобните примати. Регулацията на тези взаимно интерактивни механизми се извършва ендокринно (чрез посредничеството на хормони) и паракринно/автокринно (посредством ембриона).

Биомаркери на ендометриалната рецептивност
В проучване на Wilcox et al. се установява, че 84 % от бременностите настъпват с имплантация на ден 8^{??} - 9^{??} от лутеалната фаза и имплантиране извън този "прозорец" е свързано с повишен риск от аборт⁽⁸⁾. Резултатите от тези изследвания дефинират т. нар. *време на имплантация*, което изненадващо точно съвпада с експресията на голямо разнообразие от маркери на маточната рецептивност.

Списъка с откритите досега биомаркери на маточната рецептивност се увеличава значително като *включва имунохистохимични маркери, ултраструктурни компоненти и серумни протеини*. Всеки от един от тях има строго специфично време на експресия, което е свързано с "имплантационния прозорец". Докато маркери като калцитонина и "leukemia inhibitory factor" (LIF) се проявяват едновременно с "имплантационния прозорец", други имат характерната особеност да се експресират в обратна зависимост с периода на максимална маточна рецептивност (епителния естрогенен рецептор α (ER α), прогестеронови рецептор (PR), фактора на ендометриалното кървене (eбал/LEFTY-A) и теломеразата.

Биомаркерите могат да се подразделят на следните категории:

- **Стероидни и пептидни хормони**
Прогестеронът е главния стероиден хормон на бременността, продукт на жълтото тяло (corpus luteum), формиращо се след овулацията. Продуцирането на прогестерон започва след достигане на пик на лутеинизиращия хормон (LH). Повишените нива на прогестерона в серума са отговорни за засилената секреция на прогестин-индуцирани протеини, които дефинират прехода от пролиферативен към секреторен ендометриум. Прогестеронът е подробно изучаван като маркер за диагностициране на LPD - една от основните причини (заедно с генетичните аномалии в ембриона и антифосфолипидния синдром) за рекурентна загуба на бременност и инфертилитет. В клиничната практика, в

случаите на LPD, се прилага т.нар. *лутеална поддръжка* с редица препарати - стимулиращи жълтото тяло (HCG с уринарен или рекомбинантен производ) или с гестагенно действие (прогестерон, дидрогестерон и др.).

- Мембранно свързани протеини и муцини
Муцините принадлежат към голямото семейство на клетъчно-адхезивните молекули, които са добре изучени при ембрионите, ендометриалния епител и стромата през менструалния цикъл и по време на бременността. Този клас на клетъчно адхезивни молекули (CAMs) се състоят от хетеродимерни двойки пептиди, притежаващи α и β субединици. Заедно интактните форми на мембранно свързаните рецептори разпознават различни екстрацелуларни молекули на матрикса и голямо разнообразие от други клетъчно адхезивни молекули (CAMs).

От голям интерес е използването на **интегрините** за установяване на маточната рецептивност, както и тяхното участие в процесите на оплождане и имплантация⁽⁹⁾. Ендометриумът е активното място на интегриновата експресия. Най-малко три епителни интегрини претърпяват промени в експресията си по време на менструалния цикъл.

Експресията на $\alpha\text{v}\beta 3$ (витронектиновия рецептор), $\alpha 1\beta 1$ (колагеновия рецептор) и $\alpha 4\beta 1$ (фибронектиновия рецептор) съвпада с времето на максимална маточна рецептивност. Разположението на $\alpha\text{v}\beta 3$ на апикалния полюс на луминалния епител предполага ролята му на тези интегрини в първоначалното взаимодействие между ембриона и ендометриума.

- Секреционни протеини, растежни фактори и цитокини
Един от първите изучени ендометриални протеини е плацентарния протеин 14 (PP14), наречен още **гликоделин**⁽¹⁰⁾. Серумният гликоделин е намален при жени с LPD и понякога при жени с последователна загуба на бременността.

Няколко цитокина и растежни фактора (вкл. LIF, хепарин-свързващия епидермален растежен фактор (HB-EGF) и други се проявяват в ендометриума по време на или малко преди рецептивния период при жената, т.е. могат да се използват като полезни маркери за рецептивен

ендометриум. LIF е от основно значение за децидуализацията на клетките на ендометриума, като се открива в намалено количество при жени с инфертилитет. HB-EGF подобрява развитието на човешките ембриони в условия *in vitro* и може да се разглежда като паракринен фактор на ендометриалната регулация.

Хемокините (хемоатрактантни цитокини) са семейство полипептиди с молекулна маса от 8-12 kDa, привличащи специфични левкоцити чрез свързване към рецептори на клетъчната повърхност. В репродуктивната биология тези молекули участват в естествените процеси, като овулация, менструация, имплантация, раждане и в патологични процеси, като преждевременно раждане, инфекция с човешкия имунодефицитен вирус (HIV), ендометриоза и овариален хиперстимулационен синдром. По време на имплантацията левкоцитите инвазират ендометриума. Регулацията в маточната тъкан по време на този процес се извършва от маточните епителни клетки, които освобождават хемокини в точно определени моменти. Хемокините въздействат върху определена група от левкоцити, които от своя страна освобождават набор от протеази и медиатори, които подпомагат ембрионалната инвазия. Хемокините и техните рецептори се разделят на няколко семейства в зависимост от структурни и генетични особености.

Лептина е негликозилиран полипептид с молекулна маса 16 kDa, който е открит през 1994 г. от Zhang и сътрудници. Той е продукт на "гена на наднорменото тегло" - Obesity gene (OG) и отначало се е смятало, че се секретира от мастната тъкан. Наднорменото тегло е една от предпоставките за инфертилитет, показващо връзка между натрупването на мастна тъкан и репродуктивната система. Напоследък се обръща по-специално внимание на връзката между високата стойност на BMI (body mass index) и ниската успеваемост на забременяване при *in vitro* оплождане (IVF), към което имат отношение ендометриалната рецептивност и процеса имплантация. Тази секреция е пряко свързана с консумацията на храна, енергийния баланс и телесното тегло. Наскоро според направени проучвания се заключава, че лептина играе съществена роля в регулацията на репродуктивността.

Други биомаркери за маточната рецептивност

- **Homeobox genes** (HOXA-10, HOXA-11) са основни регулаторни гени, контролиращи други фактори, важни за имплантацията.

- Ензимът **цикло-оксигеназа-2 (COX-2)** е фактор, имащ отношение към простагландиновата синтеза.
- "**Eph-ephrin**" системата на тирозинкиназния рецептор също има отношение към имплантацията. Тези молекули регулират клетъчната миграция и ангиогенезата. Eph-A1 рецептора липсва по време на стадий 8-клетки и стадий морула, но се експресира на повърхността на бластоциста.

Потенциални структурни маркери на рецептивността

За да придобие рецептивен фенотип, луминалния ендометриален епител (LEE) претърпява структурни и функционални промени. Морфологичните промени включват модификации в плазмената мембрана и цитоскелета^(1,1).

Пиноподите представляват ултраструктурна характерна особеност на ендометриума в средната фаза от цикъла и са белег за ендометриална рецептивност^(12, 13). Описани са за първи път от Psychoyos & Mandon и са най-добре видими при сканираща електронна микроскопия. Установена е времева зависимост между пространственото проявление на пиноподите по луминалната повърхност на ендометриума през "имплантационния прозорец" и наблюденията *in vitro* условия на взаимоотношенията между тях и ембриона.

Апикалната плазмена мембрана придобива временни адхезивни свойства, след като претърпи структурни промени; дългите, тънки и симетрични микровили се превръщат в неправилни и сплеснати придатъци - процес, наречен трансформация на плазмената мембрана. Възможно е промените в организацията на епитела от поляризиран в неполяризиран фенотип да подготвя апикалния "полюс" за т.нар. клетъчна адхезия ("cell-to-cell"). Едно от предположенията за проявлението на тези ендометриални микроиздатини (пиноподи) е, че тяхната функция е свързана с абсорбиране на луминална течност от маточната лигавица. Според друго предположение ролята на пиноподите е в увеличаването на имплантационната повърхност за ембриона над всички антиадхезионни молекули (като MUS-1), които са свързани с блокиране на имплантацията.

Модифицирането на луминалната повърхност подпомага взаимодействието между ембрионалните и ендометриалните адхезионни молекули.

Друго явление, извършващо се с посредничеството на прогестерона е промяната в честотата и посоката на **фините маточни контракции**. При опити с животински модели е установено, че с увеличаването на маточната контрактилност се намалява степента на имплантиране. При човека се наблюдава обратна зависимост между нивата на прогестерона и контрактилността, както и връзката между намалената степен на забременяване и повишените маточни контракции⁽¹⁴⁾. Чрез прилагането на т. нар. "mock" трансфер и използването на 30 μ l ехогенна среда, се установява, че при леко протичащите трансфери маточните контракции са незначителни и средата не мигрира значително. При трудните трансфери се наблюдават силни и случайни контракции, като това довежда до голяма миграция на средата от региона на фундуса (в някои случаи до фалопиевите тръби).

За установяване на маточната рецептивност се използва и ултразвукова диагностика с Доплер чрез измерване на **ендометриалния кръвоток**. Трансвагиналната пулсова Доплерова ултрасонография позволява неинвазивно изследване на кръвната циркулация в матката. Установено е, че съществуват промени в кръвоснабдяването на матката и яйчниците по време на менструалния цикъл⁽¹⁵⁾. Има различия в кръвоснабдяването на матката при фертилни и нефертилни жени, както и при жени с последователни загуби на бременността⁽¹⁶⁾. Съпротивлението на кръвотока върху стените на маточната артерия също е предиктивен белег за успешна имплантация.

Клинично значение на биомаркерите и ендометриалната рецептивност

Ендометриалните маркери са добро диагностично средство за оценка на причините за инфертилитет и за обяснение на последователната загуба на бременности. Пиноподите например са доста добре изследвани при прилагането на овариални хиперстимулационни протоколи или естрогенно-заместителни протоколи за изследване на това доколко циклите, при които се прилагат методите на АРТ са сравними с нормалния менструален цикъл.

LPD е главна причина за инфертилитет при неадекватна прогестеронова концентрация или намален отговор към овариалните стероиди. Известно е, че LPD често се свързва с последователни загуби на бременност и често диагностицирана при жени с необяснен

стерилитет. Някои от биомаркерите, използвани за изследване на това явление са муцинови епитопи, пролактин, гликоделин всеки, от които се разглежда като потенциален спомагателен белег за диагностициране на LPD.

Прогестероновите рецептори на ендометриалния епител, които обикновено са подложени на т.нар. "даунрегулация" по време на имплантацията, също са подходящи като белег за диагностициране на LPD. Установено е, че жени с "хистологично изоставане" и LPD, най-често имат повишена експресия на прогестеронови рецептори (PR) по епитела през имплантационния прозорец. Това повишаване на PR експресията е свързано с намаляване на експресията на други маркери като $\alpha\beta3$ интегрин.

Ендомералните интегрини са добре проучени като потенциални маркери на маточната рецептивност⁽¹⁷⁾. Имайки предвид прецизната експресия на трите интегрини $\alpha1\beta1$, $\alpha4\beta1$ и $\alpha\beta3$ по време на менструалния цикъл може да се каже, че те са алтернатива за точното определяне на цикличните промени в ендометриума. Но сами по себе си не могат да бъдат достатъчни като точен маркер за определяне на ендометриалната прогресия. Проявлението на интегрин $\alpha\beta3$ в периода на имплантация е добър маркер за развитието на ендометриума, като той често липсва при LPD и свързаното с това изоставане в развитието на тъканите⁽¹⁸⁾.

При успешното третиране на LPD с екзогенна хормонална поддръжка се достига до възстановяване на експресията на ендометриалния $\alpha\beta3$. Има случаи, при които липсата на този интегрин не води до изоставане в хистологичното развитие. Тези отклонения са открити при изследвания, направени при пациенти с ендометриоза, хидросалпинкс и PCOS.

Съществуването на дефекти в маточната рецептивност се допълва с данни от изследвания и върху други ендометриални биомаркери като муцините, фактора свързан с ендометриалното кръвене (ebaf/LEFTY-A), PP14, LIF и HOXA-10.

От голям интерес е установяването на природата на тези дефекти; тяхното съществуване, разпространение и ефекти би довело до подобро диагностициране и съответно лечение на случаите с необяснен стерилитет и рекурентна загуба на бременност, както и до подобряването на селекционните критерии за ин витро оплождане.

Ин витро модел на взаимовръзката ембрион-ендометриум

На базата на клиничното ин витро оплождане (IVF) е развит модел, основаващ се на култивация на човешки ембриони, включително и с автоложни ендометриални епителни клетки. Култивирането продължава до стадии бластоцист, след което се провежда ембриотрансфер в матката на жената⁽¹⁹⁾. Ембрионите са резултат от рутинна ин витро процедура. Автоложните ендометриални епителни клетки са получени след ендометриална биопсия на пациентката, най-често в предходен цикъл.

Бъдещи аспекти

Нормалният, хормонално регулиран ендометриум направлява молекулярни процеси, с помощта, на които бластоциста се "информира" за нуждата от синтез на нов набор от молекули, които биха комуникирали ефикасно с него и биха довели до настъпване на имплантация. При човека преадхезивния бластоцист извършва т.нар. "upregulation" на ендометриални епителни молекули като хемокиновите рецептори и лептина. Ембрионалните молекули, отговорни за тези ендометриални ефекти изискват по-задълбочени бъдещи изследвания. Такива са нужни и за по-доброто изучаване на т.нар. адхезивна фаза и паракринния ефект, които има върху тези молекули имплантирането на бластоциста.

В бъдеще от съществено значение ще е използването на нови стратегии, базирани на навлизането на технологиите на молекулярната биология, с които се цели да се изясни разпокъсаната информация в тази област, използвайки диференциални характеристики и cDNA микрочипове.

Необходими са, също така, многобройни изследвания върху ендометриални епителни клетъчни линии и ендометриални проби за разкриване на йерархичността в процесите на ниво mRNA при молекулите, участващи в процеса на ендометриална рецептивност. Такива бъдещи открития биха били от съществено значение за програмите по асистирана репродукция, където ниската степен на имплантация остава основен проблем. Още изследвания са нужни за по-ясното разбиране на механизмите на взаимна комуникация между майчините и ембрионалните клетки⁽²⁰⁾.

Използвана литература:

1. Bergh PA, Navot D. "The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation", 1992, Fertil Steril; 58: 537-42;
2. Navot D., Scott RT, Droesch K, et al. "The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro"; 1991, Fertil Steril; 55: 114-18;
3. Fritz MA, Lessey BA. "Defective luteal function". In Fraser IS, Jansen RPS, Lobo RA, Whitehead MI. "Estrogens and progesterons in clinical practice", 1998, London, Churchill Livingstone, 437-94
4. Helege-Harting C, Mootz U, Beier M. "Luteal control of endometrial receptivity and its modification by progesterone antagonist", 1992, Endocrinology, 13: 2446-60;
5. Kao LC, Tulac S, Lobo S., et al., "Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation", 2002, Endocrinology, 8: 101-9;
6. Garcia E, Bouchard P, De Brux J, et al. "Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating", 1988, J Clin Endocrinol Metab, 67: 80-7;
7. Tibbetts TA, et al. "Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus"; 1998, Biol Reprod, 59:1143-52;
8. Wilcox Aj, Baird DD, Wenberg CR. "Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy", 1999, N Engl J Med, 340: 1796-9;
9. Lessey BA. "Integrins and uterine receptivity" In: Carson DD, ed. Embryo Implantation: Molecular, Cellular and Clinical Aspects; 1999, New York: Springer, 210-22
10. Rutanen EM, Seppala M. "Insulin-like growth factor binding protein-1 in female reproductive functions, 1992, Int J Gynaecol Obstet; 39:3-9
11. Murphy CR. "The plasma membrane transformation of uterine epithelial cells during pregnancy"; 2000, J Reprod Fertil, C55 (Suppl): 23-8;
12. Psychoyos A, Nikas G. "Uterine pinopodes as markers of uterine receptivity", 1994, Assist Reprod Rev, 4: 26-32;
13. Usadi RS, Murray MJ, Bagnell RC. "Temporal and morphologic characteristics of pinopod expression across the secretory phase of the endometrial cycle in normal cycling women with proven fertility", 2003, Fertil Steril, 79: 970-4;
14. Fanchin R, Righini C, Olivennes F. "Uterine contractions at time of embryotransfer alter pregnancy rates after in vitro fertilization", 1998, Hum Reprod, 13: 1540-6;
15. Tan AL, Zaidi J, Campbell S. "Blood flow changes in the ovarian and uterine arteries during the normal menstrual cycle", 1996, Am J Obstet Gynaecol, 175: 625-31;
16. Habara T, Nakatsuka M, Konishi H. "Elevated blood flow resistance in uterine arteries of women with unexplained recurrent pregnancy loss", 2002, Hum Reprod, 17: 190-4;
17. Kleinzeris LD, Bulmer JN, Trejdosiewicz. "Beta-1 integrin cell adhesion molecules in the endometrium of fertile and infertile women", 1993, Hum Reprod, 8: 1223-30;
18. Creus M, Balash J, Ordi J. "Integrin expression in normal and out-of-phase endometria", 1998, Hum Reprod, 13: 3460-8;
19. Simon C, Piquette G, Frances A. "Co-culture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with repeated implantation failures", 1999, J Clin Endocrinol Metab, 84: 2638-46;
20. Dominguez F, Pellicer A, Simon C "Embryonic regulation in the implantation process", 2004, Textbook of Assisted Reproductive Techniques

Адрес за кореспонденция:
Диана Гуленова
МЦ "Репробиомед" ООД
ул. "Д-р Петър Берон" 5а
1000 София
e-mail: reprobioimed@yahoo.com

smiths

Wallace Embryo Replacement Catheters



NO COMPROMISE

НОВИНИ ОТ СВЕТОВНАТА МРЕЖА

Д-р Г. Николов

МЦ "РепроБиоМед" - София

NEWS FROM THE INTERNET

Dr G. Nikolov

Medical center "ReproBioMed" Ltd - Sofia

Концентрацията на лактоферин във фоликулната течност корелира с качеството на ембрионите

Японски учени твърдят в статия, публикувана в ноемврийския брой на *Fertility and Sterility*, че лактоферинът във фоликулната течност (ФТ) играе важна роля при матurationта на овоцитите и има отношение към качеството на получените след IVF предимплантационни ембриони. На лактоферина се преписва уникално паракринно влияние върху растежа на овоцитите преди овулацията.

Atsushi Yanaihara *et al.* (Showa University School of Medicine, Tokyo) са изследвали 70 ФТ и кръвен серум от 35 пациенти, взети по време на фоликулна пункция. Изследвайки концентрациите на лактоферин (чрез ELISA) във ФТ учените са установили, че в групата на оплодените овоцити (44/70) нивата са били значително по-високи в сравнение с нивата в групата на неоплодените (26/70) - съответно 500 ng/ml и 380 ng/ml.

Аналогични данни (в полза на по-високите нива на лактоферина) са получени и по отношение на степента на развитие на ембрионите (брой бластомери) и тяхното качество 3 дни след фертилизацията.

Като извод от това проучване се налага твърдението, че по-високите нива на лактоферин във фоликулните течности, са благоприятни по отношение на фертилизацията и качеството на ембрионите.

IVF: сравнение на методи за ембриотрансфер

Ембриотрансферите под ехографски контрол (UGET) водят до по-добри резултати след IVF (повисок % бременности/ET) в сравнение с обичайния метод (т.нар. *clinical touch*) според новозеландски учени. J. Brown *et al.*, от Оукландския Университет установяват, че 33% от

1376 жени забременяват след UGET в сравнение с 26% от 1338, при които е ползван стандартния метод за ембриотрансфер.

Според R. Hines от групата по асистирана репродукция в гр. Джаксън (към университета в Мисисипи) САЩ, UGET е подходящ метод за редица пациенти, особено тези с предхождащи трудни трансфери, но едва ли би довел до драстично покачване на резултатите, ако се прилага като правило при всички жени, подложени на ембриотрансфер след IVF.

Предстоящи международни научни форуми:

1. The 9th 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

Адрес на секретариата: cogi9@comtecmed.com.

2. 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

Адрес на секретариата: gills@turnergroup.co.za

3. ISSCR, 5th ISSCR Annual Meeting, Cairns Convention Centre, Cairns Queensland, Australia, 17 - 20 юни, 2007; организиран от International Society for Stem Cell Research; 5-ти пореден международен конгрес по проблемите на стволовите клетки. Участват водещите в световен мащаб специалисти в тази област.

Повече информация на адрес:

www.isscr.org/meetings/index.htm

Адрес за общи запитвания: isscr@isscr.org

4. ESHRE, 23rd Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Lyon, France, 1-4 юли 2007; ежегодния конгрес на Европейското Общество по човешка репродукция и ембриология ще се проведе в Лион - в Двореца на конгресите, като се очаква да бъде посетен от около 7,000 делегати. Обикновено на тези форуми се разглеждат всички най-модерни аспекти на асистираната репродукция, репродуктивната биология, генетиката,

репродуктивната и минимално-инвазивната хирургия и др.

Повече информация на адрес: www.eshre.com;

Адрес на централния офис: info@eshre.com;

Адрес на секретариата:

htleshre2007@mci-group.com

5. ESHRE, 5th European Congress of Reproductive Immunology, Berlin, Germany, 30 август - 2 септември 2007 г.; организиран от Европейското Общество по човешка репродукция и ембриология, този 5^{-??} пореден международен конгрес по репродуктивна имунология, определено си заслужава да бъде посетен. На него ще бъдат засегнати всички новости в областта не само на имунологията на репродукцията, но и в репродуктивната медицина въобще.

Повече информация на адрес:

www.conventus.de/ecri

Адрес на секретариата: ecri@conventus.de



Портрет на Дж. Арнолфини и неговата съпруга,
Жан ван Айк, 1434 г., НХГ - Лондон, Великобритания

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)



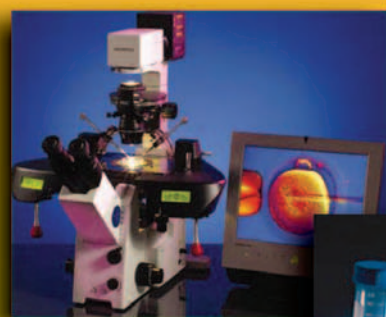
ELTA '90

ВСИЧКО ЗА IVF

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
 WEB: WWW.ELTA90.COM



SANYO

RI
 Masters of Microincubation

greiner bio-one

FertiPro

CAMBREX

Nikon

Gynetics

Женствени от изгрева

до залеза



UTROGESTAN[®] 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

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

Puregon®

recombinant FSH follitropin beta



– rFSH, чиято ефективност и ефикасност са доказана в практиката стъпка към успеха!

- * 1996 – в света е регистриран рекомбинантен FSH – follitropin beta, под името PUREGON®.
- * 1997 – само една година по-късно PUREGON® е регистриран и в България. Така за първи път в програмите за асистирана репродукция се въвежда рекомбинантен FSH – follitropin beta.
- * 2001 – за удобство и оптимизиране на дозите се въвежда PUREGON® под формата на готов за употреба разтвор.
- * 2006 – 10 успешни години за PUREGON® в програмите за асистирана репродукция по света и един милион родени деца.
- * 2007 – PUREGON® *Pen*, готов разтвор и писалка за индивидуално дозиране.



Puregon®

recombinant FSH
follitropin beta

Изобрази успеха



За повече информация:

ТРЕЙДКОНСУЛТ ЕООД, тел.: (02) 9158072

Официален представител и вносител за България