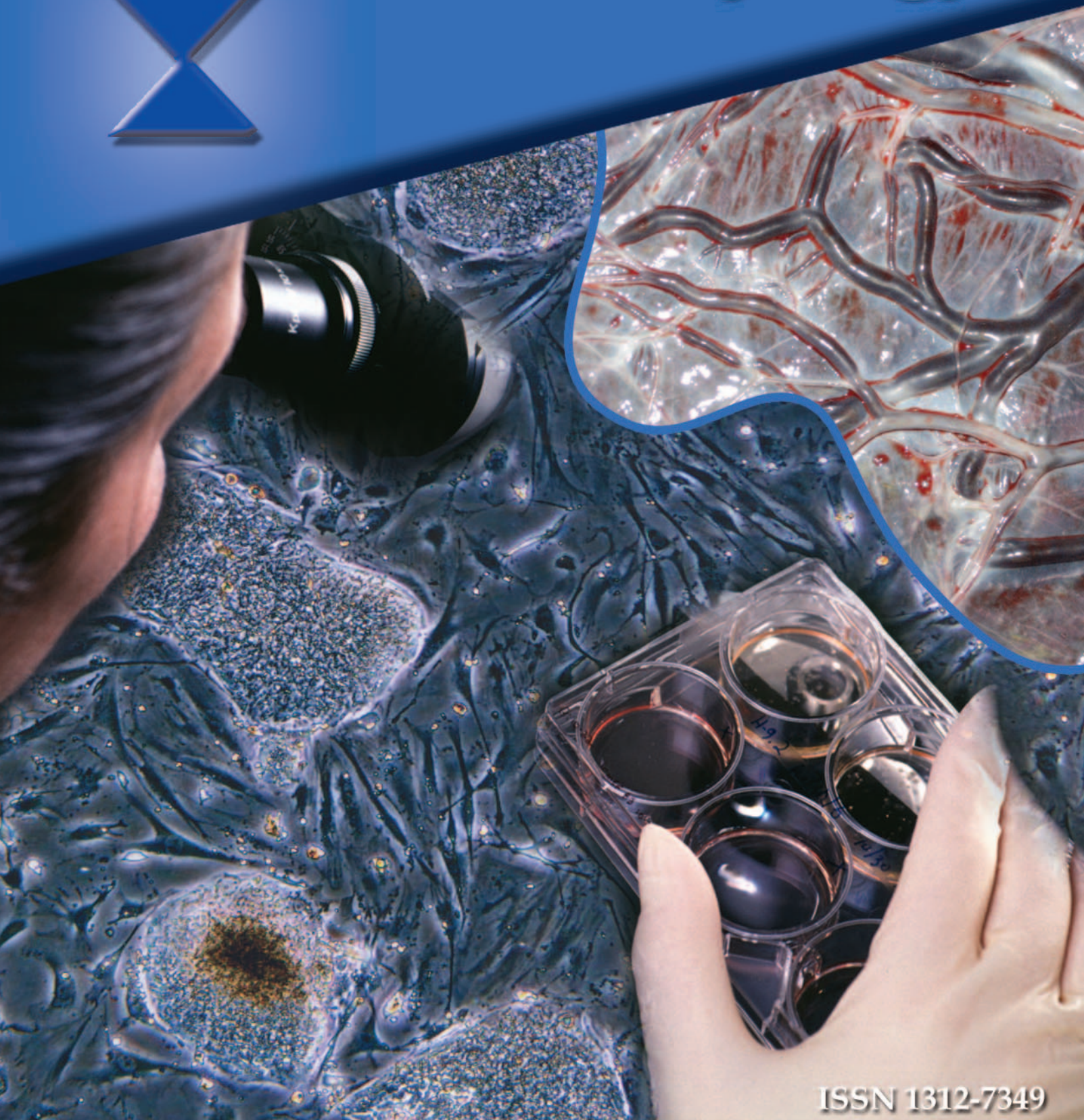


ЕМБРИОЛОГИЯ

Embryology



ISSN 1312-7349

ИЗДАВА БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ
ПО РЕПРОДУКТИВНА ЧОВЕШКА ЕМБРИОЛОГИЯ

ТОМ 2 КНИЖКА 2
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:

Експресия на нискомолекулни стресови протеини алфа-кристалини в човешка плацента при различни патологии	3
--	----------

М. Стаменова, С. Поповска, Т. Бетова, П. Рашев, Е. Сапунджиев, М. Симеонова, Н. Трифонова

Хроматинът предопределя съдбата на ембрионалните стволови клетки	11
---	-----------

М. Георгиева, Г. Милошев

Общи аспекти на ин-витро матurationта на човешки овоцити	16
---	-----------

Г. Ингилизова, Д. Тачева, Д. Петрова и Я. Владимирова

CONTENTS:

Expression of low molecular weight stress proteins (sHSPs) α-crystallins in human placenta in different types of pathology	3
---	----------

M. Stamenova, S. Popovska, T. Betova, P. Rashev, E. Sapundzhiev, M. Simeonova, N. Trifonova

Chromatin directs the fate of embryonic stem cells	11
---	-----------

M. Georgieva, G. Miloshev

Common aspects of in vitro maturation of human oocytes	16
---	-----------

G. Ingilizova, D. Tacheva, D. Petrova and I. Vladimirov

Редакционна Колегия

Д-р Георги Николов - главен редактор

Доц. 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 тази година в Боровец бе проведен “8-ми Национален конгрес по стерилитет, контрацепция, хормонозаместителна терапия и гинекологична ендоскопия с международно участие”. На този конгрес присъстваха над 450 делегати и гости от България и чужбина, включително от Белгия, Германия, Израел, Италия, Холандия и Великобритания. Според мнозина това определено бе най-успешният конгрес провеждан до сега у нас в тази област. Впрочем, благодарение и на активното участие на членовете на Нашата Асоциация.

На този форум предложихме на Вашето внимание брой 3 на сп. “Ембриология”, в което за пръв път бе отпечатана оригинална статия на английски език от чужди автори и то като официална световна премиера. Считаю, че и за напред можем да си позволим да запазим тази практика.

Междувременно членската ни маса продължава да се увеличава, включително с колеги, работещи в чужбина (Доц. М. Андонов - главен ембриолог в London womens clinic).

Неотдавна се сдобихме (за пръв път) и с относително стройно законодателство в областта на асистираната репродукция, както и със съответния медицински стандарт, отново благодарение на активното участие на БАРЧЕ. В следващите няколко броеве темата за легалните аспекти на АРТ неминуемо ще присъства заедно и с много други интересни теми. Но да не се отклоняваме от най-важното - брой 4 е пред Вас.

В него сме се постарали да съберем в едно ин витро матурацията, heat-shock протеините в човешката плацента и тема за епигенетичните механизми на контрол на стволовите клетки.

Приятно четене и до нови срещи в брой 5 на сп. Ембриология!



Д-р Георги Николов,
(главен редактор)

ЕКСПРЕСИЯ НА НИСКОМОЛЕКУЛНИ СТРЕСОВИ ПРОТЕИНИ *алфа*-КРИСТАЛИНИ В ЧОВЕШКА ПЛАЦЕНТА ПРИ РАЗЛИЧНИ ПАТОЛОГИИ

М. Стаменова, С. Поповска¹, Т. Бетова¹, П. Рашев, Е. Сапунджиев²,
М. Симеонова¹, Н. Трифонова³

Институт по биология и имунология на размножаването "Акад. К. Братанов", БАН

¹ *Медицински факултет към Медицински университет - Плевен*

² *Ветеринарномедицински факултет към Лесотехнически Университет - София*

³ *Катедра по биология, Медицински факултет към МУ - София*

EXPRESSION OF LOW MOLECULAR WEIGHT STRESS PROTEINS (sHSPs) α -CRYSTALLINS IN HUMAN PLACENTA IN DIFFERENT TYPES OF PATHOLOGY

M. Stamenova, S. Popovska¹, T. Betova¹, P. Rashev, E. Sapundzhiev²,
M. Simeonova¹, N. Trifonova³

*Institute of Biology and Immunology of Reproduction "Akad. K. Bratanov",
Bulgarian Academy of Sciences - Sofia*

¹ *Medical Faculty, Medical University - Pleven*

² *Faculty of Veterinary Medicine, University of Forestry - Sofia*

³ *Biology Department, Medical Faculty, Medical University - Sofia*

Изследването е финансирано от фонд "Научни изследвания" към Министерството на образованието и науката по проект Л-1511/05.

Резюме: Плацентата е орган с бърз растеж и висока биохимична активност. Тя е особено чувствителна към негативните фактори на средата. Един от защитните механизми на клетките към неблагоприятните фактори е синтезата на стресови протеини. Към групата на нискомолекулните стресови протеини спадат алфа-кристалините. Целта на изследването е да се проследи експресията и локализацията на алфа-кристалините в човешка плацента в норма и патология. Получените резултати демонстрират наличие на този стресов протеин в нормална плацента, както в ранните стадии от развитието ѝ (8-10 седмици), така и в терминален стадий. Неговата експресия и локализация е почти непроменена при по-голямата част от изследваните патологии, с изключение на два случая с тежки патологии, налагащи прекъсване на бременността. Този факт се свързва с участието на алфа-кристалините в процесите на клетъчна пролиферация и диференциация, както и анти-апоптоичната им роля.

Abstract: The placenta is an organ characterized by fast growth and high levels of biochemical activity. It is particularly sensitive to negative factors of the surrounding environment. One of its cells' defense mechanisms against these negative factors is the stress proteins synthesis. Alpha-crystallins are a member of the low molecular stress proteins group. The aim of our work is to study the expression and localization of alpha-crystallins in normal and pathological-ly changed human placenta. The results, which we obtained, demonstrate the presence of this stress protein in normal placenta at early stages, as well as at the final stage of its development. Its expression and localization are almost constant in most of the pathologies we have tested, except for two cases with severe pathologies that demanded termination of the pregnancies. This fact is related to the participation of the alpha-crystallins in the processes of cell proliferation, differentiation and their role in apoptosis.

Въведение

Плацентата е орган, свързващ майката и плода, който се характеризира с бърз растеж и висока биохимична активност, изразяваща се главно в интензивен синтез на белтъци. Въздействието на редица негативни фактори като: хипертермия, хипоксия, наличие на тежки метали, недостиг на глюкоза и растежни фактори, етанол, присъствие на свободни радикали, инфекциозни агенти, промяна на рН и други води до стрес на клетките^(1,2). Като резултат от действието на стреса се наблюдава денатурация и агрегация на протеините, с което се нарушава тяхната нормална функция⁽³⁻⁶⁾. Известно е, че един от защитните механизми на клетката към неблагоприятните фактори на средата е синтеза на протективни белтъци, които притежават възможността да предпазват вътреклетъчните протеини от неправилно асемблиране. Това са така наречените стресови протеини - heat shock proteins (Hsp). Шоковите протеини са високо консервативни клетъчни протеини, които се експресират във всеки организъм. В зависимост от молекулните тегла те се класифицират в различни семейства, като Hsp с молекулно тегло 20-30kD спадат към групата на нискомолекулните Hsp - sHsp⁽⁷⁾. Едни от членовете на това семейство са субединиците на структурните за очната леща протеини - кристалин - α A- (HspB4) и α B- кристалин (HspB5). α B-кристалинът се намира и в тъкани извън очната леща, докато α A-кристалинът се доказва предимно в лещени тъкани. Най-високи нива на α B-кристалин (освен в очната леща) се намират в сърце, мускули, мозък, бял дроб⁽⁸⁾. Високи нива на експресия на α B-кристалин са открити в тъкани с продължителен интензивен окислителен метаболизъм, напр. сърце и диафрагма⁽⁹⁾. Оскъдни са данните за експресия на α B-кристалин в човешка плацентата и евентуалните му промени при патологии свързани с бременността.

Целта на настоящото изследване е да се проследи присъствието и локализацията на α -кристалини в нормална плацентарна тъкан и при различни патологии на плацентата.

Материали и методи

Поликлонален имунен серум срещу α -кристалин беше получен след имунизация на заек с изолирания антиген по схема описана от Zigler *et al.*, 1980⁽¹⁰⁾. Чрез абсорбционни процедури серумът беше доведен до моноспецифичност и приложен за доказване присъствието и локализацията на α -кристалин в изследваните тъкани. За проследяване експресията и

локализацията на α -кристалин бяха изследвани тъканни срези от нормална терминална плацентата (2 случая) и плаценти от 17 случая с различни патологии.

Беше приложен *авидин-биотин пероксидазен метод* с Universal Elite ABC kit (Vectastain, Burlingame, CA 94010) за установяване локализацията на алфа-кристалините в изследваните тъкани в следната последователност:

- Депарафиниране и дехидратиране на срезите в ксилол и падащи разреждания на алкохолите за 5 мин. във всеки на стайна температура;
- След измиване на срезите с фосфат буфериран физиологичен разтвор (PBS) бе блокирано неспецифичното свързване с 2,5% конски серум за 20 мин. на стайна температура;
- Инкубиране с поликлонален заешки анти-алфа-кристалинов серум (първо антитяло) за 18 часа на 4 °C;
- След трикратно измиване с PBS, срезите бяха инкубирани с биотинилирани конски анти-заешки IgG (второ антитяло), разрежено 1/400;
- След ново трикратно измиване беше осъществено инкубиране със стрептавидин-пероксидаза;
- Реакцията бе проявена с 3,3'-диаминобензидин тетраhydroхлорид (DAB) и стопирана след 5 мин. с дестилирана вода.
- Срезите бяха контраоцветени с Mayer's хематоксилин, дехидратирани и включени в канадски балсам.

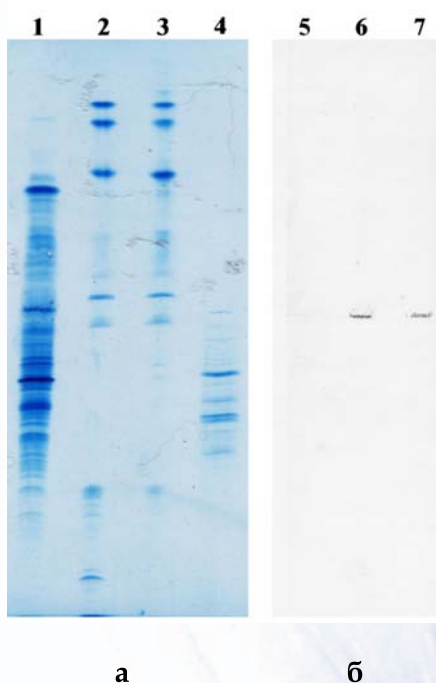
За определяне локализацията на интересувания ни антиген, тъканните срези бяха наблюдавани с микроскоп Olympus BX 40 и фотографирани с цифрова камера.

Изоелектрофокусиране (IEF) бе осъществено върху полиакриламиден гел (30% T, 3% C) 1 mm, съдържащ Ampholine 3-10 (Amersham). Пробите се разтварят в 7M урея и се нанасят върху апликаторни хартийки, поставени върху гела. Разделянето протича в продължение на 2 часа при 2000V, 14mA и 14W. След завършване на разделянето, гелът се оцветява с Coomassie или разделените протеини се трансферират върху нитроцелулозна мембрана, която след това беше инкубирана със съответно специфично към търсения антиген (α -кристалин) и второ-маркирано с ензим (пероксидаза) антитяло, а реакцията беше проявявана с добавянето на хромогенен субстрат. За пренасяне на белтъците

върху нитроцелулозна мембрана беше използвано устройство за полусух пренос (Semi-dry elektrobloetter, Ancos, Denmark). Белтъците бяха пренасяни за 60 мин. при постоянна сила на тока, съответстваща на $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$ гел.

Резултати

Чрез прилагане на изоелектрофокусиране (фиг. 1-а) и последващ имуноблот (фиг. 1-б) бе проследено наличието на αV -кристалин в човешка плацента - 8-10 седмична и терминална. Като контрола бе използвана изолирана от фетална очна леща фракция, съдържаща алфа-кристалини (фиг. 1-а₁). Като специфични антитела беше приложен моноспецифичен заешки анти-алфаВ-кристалинов серум (Calbiochem).



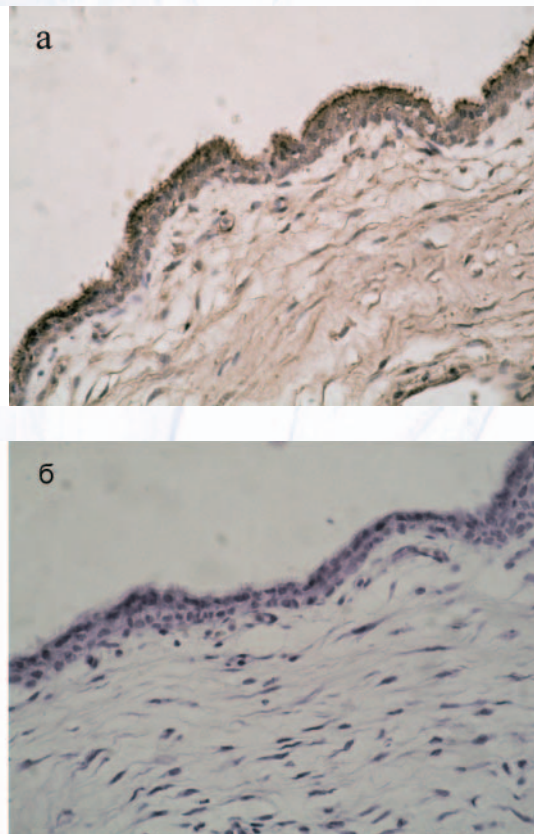
Фигура 1. Изоелектрично фокусиране (а) и последващ имуноблот (б) с използване на специфичен анти алфаВ-кристалинов серум.

- 1 тотален лещен екстракт (съдържащ алфа-кристалини)
- 2 кит за изоелектрична точка pI 3 -10
- 3 кит за изоелектрична точка pI 5 - 10,5
- 4 фракция алфа-кристалини, изолирана чрез гелна хроматография
- 5 фракция алфа-кристалини, изолирана чрез гелна хроматография, разделена чрез изоелектрофокусиране и инкубирана с анти алфаВ-кристалинов серум в условията на имуноблот.
- 6 терминална плацента, разделена чрез изоелектрофокусиране и инкубирана с анти алфаВ-кристалинов серум в условията на имуноблот.
- 7 ранна (8-10 седмична) плацента разделена чрез изоелектрофокусиране и инкубирана с анти алфаВ-кристалинов серум в условията на имуноблот.

Както се вижда от фигурата, присъствието на αV -кристалиновата субединица е категорично демонстрирано и в двете плаценти - ранна и терминална. За потвърждаване на присъствието и определяне локализацията на нискостресовите

протеини α -кристалини в срези от плацента беше приложен АБС-имунопероксидазен метод на тъканни срези от нормална плацента и на плаценти от различни патологии (таблица 1).

При нормалната плацента бе наблюдавана добре изразена експресия на антигена в епитела на хориалните въси и синцитиума; зърнести образувания в цитоплазмата на синцитиотрофобластта, цитоплазмена реакция в мезенхимоцитите и ендотела на артериолите и капилярите (фиг. 2).



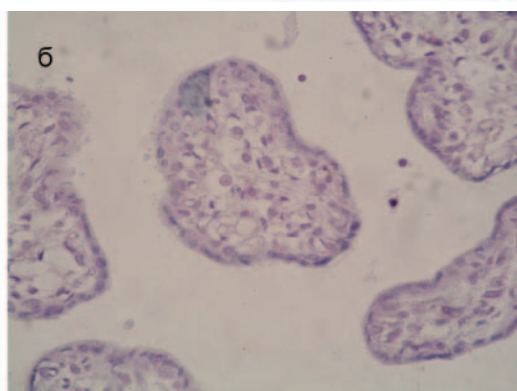
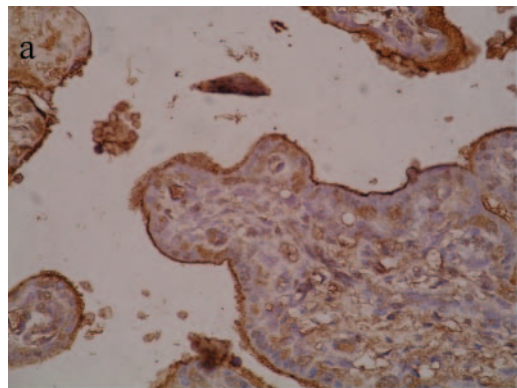
Фиг.2. Локализация на алфа-кристалини в нормална терминална плацента; а) опитна проба, б) контрола без анти α -кристалинов серум

Описаната картина се наблюдава и при по-голямата част от патологиите. При случая с клинична диагноза Abortus incompletus ml V-VI (F.mortus) и хистологична диагноза - интравилосни кръвоизливи, отлагане на фибриноид (Таблица 1, № 1), беше наблюдавано отсъствие на реакция в цитоплазмата на цитотрофобластта; изключителна апикална експресия на антигена, само в отделни клетки се наблюдава слаба цитоплазмена реакция (фиг. 3).

При случай с клинична диагноза Obs. HELLP S-m. St.post sectio Caesarea и хистологична диагноза интервилосен хематом, анемичен инфаркт; кръвоносни съдове с метакромазия, зонирание на

№	Име	Год.	Клинична диагноза	Хистологична диагноза - плацента с:
1	МС	20	Abortus incompletus ml V-VI. (Foetus mortus)	Интервилозни кръвоизливи, отлагане на фибриноид
2	АСВ	27	Abortus completus (F.mortus) Малформативен синдром	Хиперсегментация, фиброзиране на въси, отлагане на калциеви соли, анемичен инфаркт
3	МАГ	30	Partus praematurus ml VIII (bigemini). Placentitis chronica	Хиперсегментация на въси, отлагане на фибриноид, интервилозен кръвоизлив, анемичен инфаркт
4	НГА	33	Grav. ml X, praeclampsia, (Sectio Caesarea), Pl. chronica	Хиперсегментация на въсите, фиброзиране, калциеви отлагания, анемичен инфаркт
5	ТНГ	28	HELLP синдром. (Sectio Caesarea)	Интервилозен хематом, анемичен инфаркт, кръвоносни съдове с метахромазия, зонирание на синцитиума, хиперсегментация на въси, микрокалцификати
6	СПХ	24	Partus normalis. Майка с ХМП	Зонирание на синцитиума, отлагане на фибриноид, фибриноидни депа и некротични въси
7	ТВБ	25	Gr.ml X., hypotrophia foetus, asphixia foetus (фето- плацентарна инсуфициенция)	Анемичен инфаркт, отлагане на фибриноид, остър базален плацентит
8	БЦП	14	Ab. inc. ml VII. (Abrasio residuorum)	Хиперсегментация и огнищно отлагане на фибриноид
9	ММД	24	Grav. ml X. Oligohydramnion (S. Caesarea). Плацентарна инсуфициенция	Хиперсегментация, фиброза на въсите, отлагане на калциеви соли, анемичен инфаркт
10	ДСЯ	26	Abruptio placentae partialis. Плацентарна инсуфициенция	Хиперсегментация, зонирание на синцитиума
11	ТНБ	41	F. mortus ml IV-V. Abr. residuorum.	Огнища с отлагане на фибриноид, остър хориоамнионит
12	ПБД	27	Chorioamnionitis	Зонирание на синцитиума, отлагане на фибриноид, калцификати, лек обострен хориоамнионит
13	ТБС	24	F. mortus. Ab.incompl.ml IV	Отлагане на фибриноид и зонирание на синцитиума
14	КМП	23	Abruptio placentae partialis. Ab. incompl. (Abrasio residuorum)	Повишено отлагане на фибриноид, хронично възпалителни инфилтрати, отлагане на калциеви соли, субамнионален кръвоизлив, хиперсегментация
15	ДИА	22	Praeclampsia Placentitis ac. (S.Caesarea)	Остър гноен базален плацентит, хиперсегментация, зонирание на синцитиума, фиброза
16	АДВ	27	F.mortus ml V. Ab. incompletus	Умерено отлагане на фибриноид
17	АЖД	26	Obs.placenta adhaerens	Хиперсегментация на въсите, фиброзиране калциеви отлагания

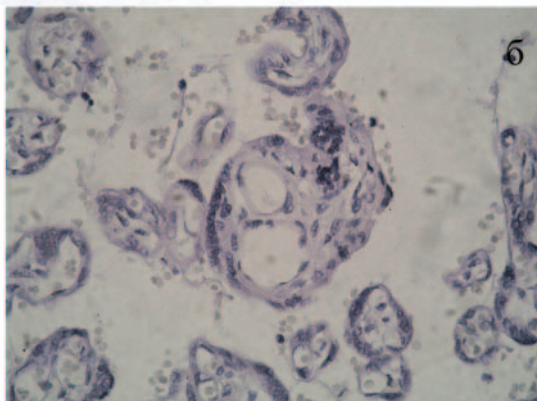
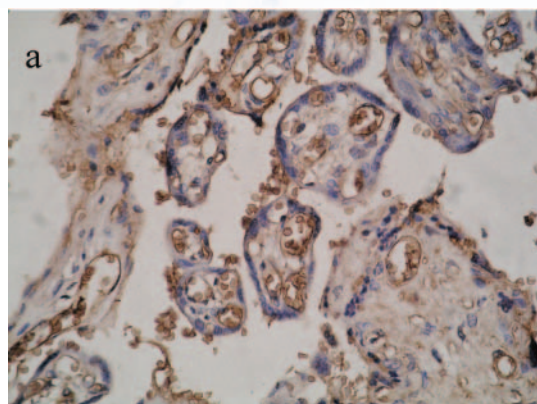
синцитиума, хиперсегментация на въси, микрокалцификати (Таблица 1, № 5) също се наблюдава по-слаба експресия в отделните участъци на хориона (фиг.4)



Фиг.3. Локализация на алфа-кристалин в плацента през ml IV - V с диагноза Abortus incompletus с мъртъв плод;
а) опитна проба, б) контрола без анти -кристалинов серум

Обсъждане

Повечето представители от семействата на протеините на топлинния стрес са широко експресирани в различни тъкани и органи, свързани с репродукцията при бозайниците. Някои Hsp (Hsp90, 70, 60 и Hsp27) са доказани и в плацента, по-точно в децидуалната ѝ част по време на първия триместър на бременността^(11,12). Установено е, че експресията на Hsp не се различава при плацента, получена след нормално раждане и такава, получена при преждевременно раждане⁽¹³⁾. Тези данни предполагат важната роля на Hsp в ранните и по-късни стадии на бременността. Получените от нас резултати доказват експресията и на неизследвания досега в човешка плацента нискомолекулен стресов протеин α -кристалин. Проведеното имунохистохимичното изследване показва цитоплазмена локализация и специфично клетъчно разпределение на α -кристалин - предимно в стромата и синцитиотрофобластта на плацентарните вили. Цитоплазмената локализация на α -кристалина е доказана и в



Фиг.4. Локализация на алфа-кристалин в терминална плацента след sectio Caesarea с диагноза HELLPs; а) опитна проба, б) контрола без анти α -кристалинов серум

други изследвани тъкани⁽⁸⁾ и подобно на други изследователи не се открива разлика в интензитета и локализацията на имунната реакция при нормална плацента и по-голямата част от патологиите. При два от случаите обаче (№1 и №5) се наблюдава значително по-слаба и атипична експресия на протеина. Въпреки че физиологичната роля на голяма част от нискомолекулните стресови протеини, в това число и на алфа-кристалините не е изяснена, категорично се приема, че една от функциите им е на молекулни шаперони - да поддържат ензимните активности и конформацията на клетъчните протеини. За α B-кристалина е установено, че по време на ембрионалното развитие се наблюдава в районите, претърпяващи най-значителна морфологична реорганизация⁽¹⁴⁾. При опити с клетъчни култури е потвърдена неговата регулаторна роля в клетъчната диференциация и апоптоза⁽¹⁵⁾. Той предпазва миша клетъчна линия L929 от индуцирана от TNF- програмирана клетъчна смърт⁽¹⁶⁾. Всички тези, макар и непълни данни относно ролята на B-кристалина дават основание спекулативно да свържем необходимостта от неговото оптимално присъствие за процесите на клетъчна пролиферация и диференциация, а от там и за нормалното развитие на плацентата.

ИЗПОЛЗВАНИ ИЗТОЧНИЦИ:

1. Hall HK, Karem KL, Foster JW (1995) Molecular responses of microbes to environmental pH stress. *Adv Microb Physiol* 37:229-272
2. Conway de Macario and Macario AJ, 1994, Heat-shock response in Archaea. *Trends Biotechnol* 12:512-518
3. Glover JR, Lindquist S (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94:73-82
4. Gottesman S (1998) Protecting the neighborhood: extreme measures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2731-2732
5. Herman C, D'Ari R (1998) Proteolysis and chaperones: the destruction/reconstruction dilemma. *Curr Opin Microbiol* 1:204-209
6. Parsell DA, Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27:437-496
7. Taylor Ryan P, Ivor J Benjamin (2005) Small heat shock proteins: a new classification scheme in mammals. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38:433-444.
8. Bhat SP, Nagineni CN (1989) Alpha B subunit of lens-specific protein alpha-crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 158:319-325.
9. Inaguma Y, Hasegawa K, Goto S, Ito H, Kato K (1995) Induction of the synthesis of hsp27 and alpha B crystallin in tissues of heat-stressed rats and its suppression by ethanol or an alpha 1-adrenergic antagonist. *J Biochem (Tokyo)* 117:1238-1243
10. Zigler J.S., J. Horwitz, J.H. Kinoshita. Studies on the low molecular weight proteins of human lens. *Exp. Eye Res.*, 31, 1980, 41-55.
11. Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwald Z,, Witkin SS (2000). The role of heat shock proteins of reproduction. *Human reproduction Update* 6:149-159.
12. Shah M, Stanek J, Handwerker S (1998). Differential localization of heat shock proteins 90, 70, 60 and 27 in human decidua and placenta during pregnancy. *Histochem J* 330:509-518.
13. Divers MJ, Bulmer JN, Miller D, Lilford RJ, 1995 Placental heat shock proteins: no immunohistochemical evidence for a differential stress response in preterm labour. *Gynecol Obstet Invest* 40:236-243.
14. Scotting P, McDermott H, Mayer RJ. 1991, Ubiquitin-protein conjugates and alphaB crystallin are selectively present in cells undergoing major cytomorphological reorganisation in early chicken embryos. *FEBS Lett* 285:75-79.
15. Chang Y, Abe A, Shayman JA (1995) Ceramide formation during heat shock: a potential mediator of alpha B-crystallin transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12275-12279
16. Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, Arrigo AP (1996a) Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death. *Embo J* 15:2695-2706



Merck Serono Reproductive Health

Merck Serono - световен лидер
в лечението на безплодие





Life's beginning – in safe hands

EmbryoAssist™

Improved performance and flexibility



ХРОМАТИНЪТ ПРЕДОПРЕДЕЛЯ СЪДБАТА НА ЕМБРИОНАЛНИТЕ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

М. Георгиева, Г. Милошев

Лаборатория по Молекулярна Генетика, ИМБ - БАН, София

CHROMATIN DIRECTS THE FATE OF EMBRYONIC STEM CELLS

Laboratory of Molecular Genetics, Institute of Molecular Biology,
Bulgarian Academy of Sciences - Sofia

Резюме: Ембрионалните стволови клетки притежават огромен потенциал като източници на клетки за трансплантация, разработване на нови лекарства и като обект за изследване на ранните етапи от ембрионалното развитие. Плурипотентната природа на стволовите клетки се основава на две противоположни техни свойства - поддържане на специфичните за диференциация гени в изключено състояние и едновременно с това запазване на възможността за тяхното включване, когато е необходимо. Учените са открили някои от предпоставките за състоянието на "стволовост" на тези клетки. Понастоящем се предполага че в ембрионалните стволови клетки основна роля в тези процеси играят епигенетични механизми. В този обзор ние правим преглед на съвременното разбиране за ролята на хроматиновата структура и нейната динамика като част от епигенетичната природа на ембрионалните стволови клетки в процесите на запазване на техния неограничен потенциал за делене, както и на способността им да се диференцират в различни клетъчни типове. Дискутира се как хроматинът предоставя основата за насоченото активиране на гените и дирижира диференциацията на тези клетки.

Abstract: Embryonic stem cells retain great potential as a source of cells for transplantation therapy, development of new drugs, and as models for early embryonic development. The pluripotent nature of stem cells relies on two opposing requirements - to keep differentiation-specific genes switched off while preserving the ability to switch them on quickly when needed. Scientists have taken a step toward unlocking the mystery of this "stemness". It is now believed that the epigenetic program of ES cells plays crucial role in these processes. Here, we review the current understanding of the role of chromatin structure and dynamics as a part of the epigenetic landscape of ES cells in the processes of preserving their unlimited potential to divide, as well as to differentiate in all types of cell lineages. We discuss how chromatin provides molecular base for targeting gene activation potential and directing the ES cells differentiation.

Introduction

One of the major challenges of developmental biology has been to elucidate mechanisms by which a structurally and functionally heterogeneous organism is built from genetically homogeneous cells. As a first step it has always been difficult to determine how pluripotent cells, called stem cells, form different cell lineages within a developing blastocyst.

What are the Embryonic Stem (ES) cells?

According to a recent definition the Embryonic Stem (ES) cells are "Pluripotent stem-cell lines derived from early embryos before formation of the tissue germ layers"⁽¹⁾. There are three types of stem cells that have embryonic origins:

- embryonic stem cells, derived from the inner cell mass of developing blastocysts. They are pluripotent and able to differentiate into cellular derivatives of all three primary germ layers;
- embryonic stem cells, called embryonic germ (EG) cells, derived from the primordial germ cells of the post-implantation embryos;
- embryonal carcinoma (EC) cells, derived from embryonic tumors⁽²⁾.

ES cells possess two ultimately connected features that make them unique: an unlimited potential to self-renew and an ability to differentiate into multiple cell lines. The undifferentiated state of ES cells lacks tissue-specific features. Furthermore, when exposed to appropriate biological signals, these cells

are capable of differentiating into all kinds of specialized cells types, a process, connected with loss of their pluripotency and dramatic morphological and molecular changes⁽⁵⁾.

What could ES cells be used for?

Now, 25 years after the first isolation of mouse embryonic stem cells, it is possible to isolate and culture stem cells from embryos of many species, including humans. Markedly, the pluripotency of ES cells has elicited enormous interest regarding their potential applications for cell-replacement therapies for degenerative diseases, such as Type I Diabetes, Parkinson disease, cancer and many others. The recent success of establishing human ES cell lines has ignited great excitement over stem cell research in the biomedical field. On the other hand, progress in human ES cell research has been hindered by difficulties due to the poor understanding of the molecular and cellular basis of pluripotency. The lack of knowledge often leads to failure of maintaining of ES cells. Therefore, discovering how the properties of ES cells are governed and directed is a question of great importance.

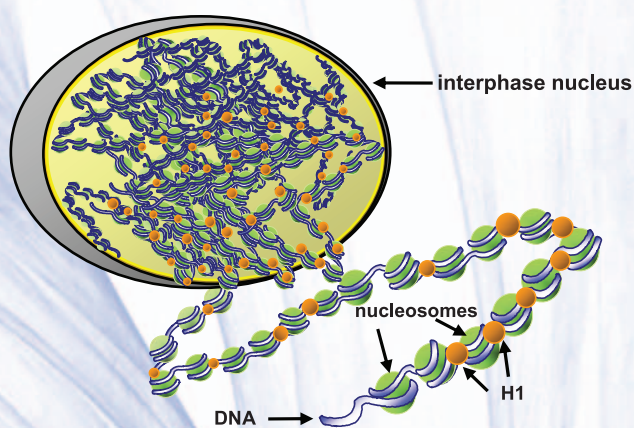


Figure 1. Chromatin organization in the eukaryotic nucleus

Which are the epigenetic mechanisms that play a key role in ES cells pluripotency and cell lineage determination?

Cellular differentiation involves large changes in gene expression together with alterations in genome organization and chromatin structure. All these changes are under control of epigenetic mechanisms, i.e. a heritable code other than the DNA sequence that include changes in the chromatin structure, DNA methylation, post-translational modifications to the histones, ATP-chromatin remodeling, exchange of histone variants, and small RNA molecules⁽⁴⁾. The combinatorial association of these epigenetic marks on developmentally regulated and lineage-specifying genes in undifferentiated cells seems to define the pluripotent state.

What is chromatin and how it works - as a part of the epi-

genetic mechanisms?

Genomic DNA in the eukaryotic nucleus is packed into a compact structure known as chromatin. The fundamental unit of chromatin is the nucleosome, which is composed of two copies of each of the core histones-H2A, H2B, H3 and H4-wrapped by 146 bp of DNA⁽⁵⁾. Nucleosomes in turn, are connected by linker DNA and histone H1. This primary structural sequence is referred to as the "beads-on-a-string" structure⁽⁶⁾ (Fig. 1). In the eukaryotic nucleus, chromatin is folded into higher-order structures, of which our understanding is very limited. It is considered now that the genome is organized in complex chromatin structures as loops, with different size, speckles and chromosome territories⁽⁷⁾.

In this review we will focus on one of the major players in the epigenetic program of ES cells involved in the keeping of their pluripotent state and the possibility to differentiate - the chromatin structure and its dynamics.

How chromatin dictates ES cells fate

One of the main determinants of ES cells is their nuclear and chromatin structure. It is becoming clear that chromatin structure holds some of the secrets for pluripotency, stem cells identity, regulation of differentiation and cellular fate.

Nuclear architecture of the ES cells

The mammalian nucleus contains a large number of distinct sub-compartments in which specific functions, such as transcription and RNA processing, are carried out. The genome is non-randomly organized within the nucleus. Chromosomes occupy discrete chromosome territories, and single genes are specifically arranged within both these territories and the nucleus⁽⁸⁾. These preferential positions are functionally very important as they vary among different tissues and during development⁽⁹⁾.

A specific difference between ES cells and differentiated cells is the absence of lamins A and C⁽¹⁰⁾, which are the nuclear structural proteins that play important roles in the keeping of the nuclear shape and integrity and presumably in the genome functioning⁽⁷⁾. Interestingly, the position of some chromosomes in ES cells is variable. For example the human chromosome 12, which contains a genomic region that is enriched with ES-cell-specific genes⁽¹¹⁾, including the stem-cell marker NANOG, changes its preferential nuclear position and localizes significantly more centrally in human ES cells compared with differentiated B cells⁽¹²⁾. Furthermore, centromeres in ES cells are mainly found within the nuclear interior, whereas, in differentiated cells, centromeres tend to localize at the nuclear periphery. However there are exceptions from this rule: some chromosomes, like

chromosomes 18, 19 and 6, the last containing the pluripotency marker OCT4, are in similar positions in human ES cells and differentiated cells⁽¹²⁾. A more complete characterization of the nuclear landscape in pluripotent ES cells will be a useful basis for a cell-biological understanding of these cells.

Determinants of the chromatin structure in the ES cells

Direct visualization of centromeric heterochromatin with a probe against the major satellite-repeat sequence reveals a more diffuse heterochromatin structure in undifferentiated ES cells versus more compact heterochromatin with well-defined foci in ES-derived neuronal progenitor cells (NPCs)⁽¹³⁾.

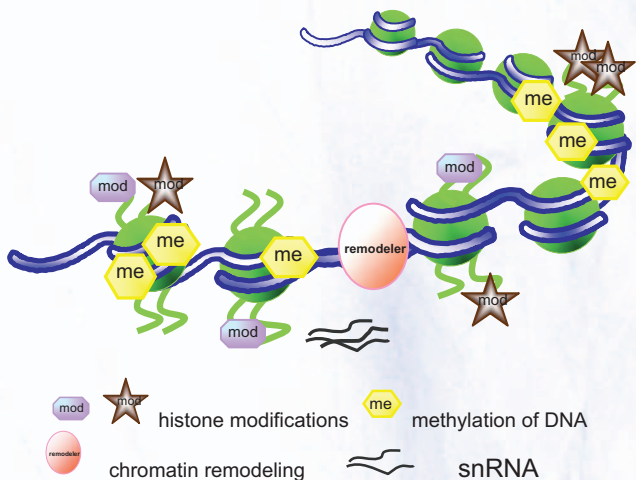


Figure 2. Epigenetic mechanisms in ES cells

It is becoming clear that chromatin binding proteins associate with chromatin only transiently. This phenomenon is particularly evident in undifferentiated embryonic stem cells and other multipotent cells, where a fraction of loosely bound chromatin binding proteins is present. This hyper-dynamic population of chromatin proteins includes the linker histones, the heterochromatin protein HP1 and the high mobility group (HMG) proteins representing 10-25% of the total protein population. These proteins are characterized by a residence time from a few seconds to several minutes⁽¹³⁾. The presence of this dynamic protein population is a true hallmark of pluripotent cells. Moreover, the chromatin of ES cells is also marked by the existence of an unbound or loosely bound fraction even from the otherwise tightly associated core histones⁽¹⁴⁾. Notably, in fetal ES cells there is a complete absence of the specific for the differentiated cells linker histone subfraction - H1zero (Todorov and Miloshev, unpublished). A wealth of data support a model in which ES cells preserve the potential to differentiate into multiple cell types by maintaining a loosely bound fraction of histones and other chromatin-associated proteins, which through free exchange with bound histones and chromatin, generate a state of active, “breathing” chromatin.

Post-translational modifications of histone proteins and DNA methylation in ES cells

Although, the molecular mechanisms for self-renewal, maintenance of pluripotency and lineage specification are poorly understood, emerging data point to a key role for the post-translational modifications of the histone proteins as well as for the process of DNA methylation (Fig. 2).

Global epigenetic landscape of ES cells

ES-cell chromatin possesses some unique and very interesting features when compared to the chromatin of other types of cells. It is overall more active and marked with activity-associated histone modifications. Accordingly, recent mapping of histone modifications has shown that developmentally regulated genes in ES cells, which are either silent or active in differentiated somatic cells, are in a potentially active state in pluripotent ES cells. Genome-wide and locus-specific ChIP analyses reveal that these genes in ES cells are marked by repressed but potentially active promoters by association with the so-called “bivalent” histone modifications. These “bivalent” modifications are characterized by histone H3-triMeK4, a mark of active genes, and histone H3-triMeK27, which associates with inactive genes^(15,16) (Fig. 3A). At the genome-wide level, these “bivalent domains” consist of large regions of H3-triMeK27, embedding smaller areas of H3-triMeK4⁽¹⁶⁾.

DNA cytosine methylation at the gene promoters is another major epigenetic factor, which usually is assumed as a repression mark⁽¹⁷⁾. Exclusively, ES cells are almost completely devoid of DNA methylation⁽¹⁸⁾. Furthermore, the treatment of partially differentiated ES cells with the demethylating agent 5-azacytidine (5-azaC) induces de-differentiation⁽¹⁹⁾, leading to the assumption that the methylation of DNA generally induces differentiation.

Epigenetic features of particular genes in ES cells

Together with the global changes, local histone modifications have been shown to be important for the proper control of differentiation-specific genes in ES cells. It has been shown that the promoters of active genes in ES cells, such as OCT-4 and NANOG are marked by acetylation of histones H3 and H4 - a generally active mark⁽²⁰⁾. A number of critical transcription factors for cell lineage determination, including Sox1, Nkx2-2, Msx1, Irx3 and Pax3 are not expressed in ES cells, but are associated with both activating (H3-AcK9 and H3-MeK4) and repressive (H3-MeK27) histone modifications^(15,16). Besides, recent results have confirmed these “bivalent” histone modification patterns at other key developmental genes in ES cells. They have shown that the promoters of the genes POU and HOX contain large stretches of H3-triMeK27 together with H3-triMeK4⁽¹⁶⁾. This per-

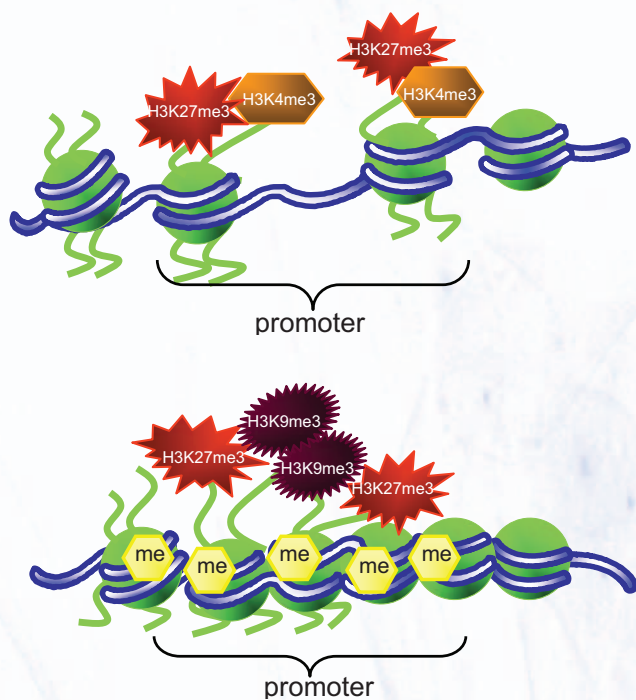


Figure 3. Chromatin organization in the eukaryotic nucleus

missive chromatin conformation at lineage-control gene loci in ES cells would make these genes accessible for chromatin remodeling complexes and transcription factors for subsequent transcriptional initiation in response to appropriate environmental cues.

An exception from the rule for the “bivalent” histone modifications are other lineage-control genes, including MYF5 and MASH1⁽²¹⁾. Myf5 is a member of MyoD transcription factor and is a critical regulator for muscle lineage determination, whereas Mash1 is critical transcription factor for the production of neural precursor cells⁽²¹⁾. In addition, studies by Bernstein⁽¹⁶⁾ have shown that some key developmental genes, like PBX3 are marked only by H3-MeK4, while others, including FOXP1, are marked by H3-MeK27. The functional consequences of these differences are yet not known.

General key events that govern the transition of ES cells from pluripotent to a committed state

The general key events that govern the process of differentiation is the selective silencing and activation of specific subsets of genes, in combination with global chromatin reorganizations via chromatin remodeling events and epigenetic mechanisms⁽²²⁾.

Selective silencing and activation of specific genes

The process of differentiation is an excellent model system for studying the role of chromatin dynamics, since the same cell with fixed genetic material transforms from one type to another. This transition involves perfect tuning between chromatin structure, chromatin modifications, histone variants and chromatin remodeling.

Differentiation of ES cells is associated with global changes in post-translational modifications of core histones, as well as in the methylation of DNA. Examples are the differentiation-dependent increase in the silenced chromatin mark tri-methylated residue K9 of histone H3 (H3-triMeK9) and a decrease in the global levels of acetylated H3 and H4^(14, 23). In other words, differentiation is accompanied by a transition to transcriptionally less-permissive chromatin (Fig. 3B). Furthermore during differentiation ES cells acquire specific DNA methylation patterns. One of the most prominent stem cells markers Nanog and Oct-4 involve sequential DNA methylation of their promoters, as well as accumulation of the inactive histone modification mark H3-triMeK9 concomitant to their differentiation-induced silencing⁽¹⁸⁾. While lineage-specific genes, mentioned in Section II, undergo activation by removal of H3-triMeK27.

Chromatin dynamics of the differentiation committed ES cells

Little is known about how proteins interact with chromatin in pluripotent ES cells and how their interactions are changed as cells begin their differentiation process. Changes in chromatin of ES cells induced to differentiation are brought about by the interaction of a multiple of proteins with chromatin and changes in chromatin structure. Hyperdynamic binding of structural chromatin proteins is a functionally important hallmark of pluripotent ES cells and upon differentiation, the fraction of hyperdynamic proteins becomes immobilized on chromatin⁽¹⁴⁾. This tightly binding of chromatin proteins provides essential building blocks for the formation of chromatin domains as cells execute their specific expression programs by the targeted sequestration of genes into active and repressive chromatin domains.

By comparing the morphological appearance of heterochromatin regions in undifferentiated pluripotent ES cells and ES cell-derived neuronal precursor cells has been found that heterochromatin undergoes substantial spatial rearrangements during the very earliest stages of ES cell differentiation⁽¹³⁾. While heterochromatin showed a more dispersed pattern, heterochromatin in neuronal precursor cells (NPCs) appeared more similar to what is typically observed in somatic cell types showing heterochromatin compaction and concentration in distinct foci. In addition, in ES cells, FISH signals of satellite repeats show a more diffuse signal not restricted to distinct foci, and these regions became more condensed in NPCs.

The positioning of chromosomes within the nucleus might not be of functional relevance in ES cells; the spatial organization of single genes, however, might be because several key ES-cell genes undergo significant positional changes during differentiation that

are similar to those observed in other differentiation systems. NANOG relocates from a more peripheral position in human ES cells compared with B cells, and the OCT4 gene seems to be looping out from its chromosome territory⁽¹²⁾. A similar chromosomal extrusion was observed for the HoxB locus in mouse ES cells after induced differentiation. Whether these positional changes are a cause or consequence of the transcriptional status and whether they are required for proper regulation is unknown.

Future perspectives

The emerging possibilities to direct cell differentiation

One of the fundamental mysteries of biology is the basis of cellular state. Although they have essentially identical genomes, the different cell types in a multicellular organism maintain markedly different behaviours that persist over extended periods. The most extreme case is lineage commitment during development, where cells progress from pluripotency to terminal differentiation with the establishment of a stable state, connected with activation of specific developmental genes. Considerable evidence suggests that the cellular state may be closely related to "chromatin state". Elucidating this "chromatin-state" in ES cells will be important to examine their entire genome as well as to follow their fate during development and differentiation. Furthermore, insights into the role of chromatin structure and dynamics in the maintenance and regulation of proliferative potential of ES cells may aid in the discovery of novel treatments for deregulated proliferative cells such as cancer.

REFERENCES

- Smith, A. A glossary for stem-cell biology; 2007, Nature, 441: 1060
- Islam MQ, Islam K, Sharp CA. Epigenetic reprogramming of non-replicating somatic cells for long-term proliferation by temporary cell-cell contact; 2007, Stem Cells Devel, 16: 253-268
- Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic stem cells; 2004, Cell Prolif, 37: 23-34
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code; 2001, Science, 293: 1074-1080
- Luger K, Mader AW, Richmond RK *et al.* Crystal structure of the nucleosome particle at 2,8 Å resolution; 1997, Nature, 389: 251-260
- Robinson PJ, Rhodes D. Structure of the "30nm" chromatin fibre: A key role for the linker histone; 2006, Curr Opin Struct Biol, 16: 336-343
- Spector D.S. The dynamics of chromosome organization and gene regulation; 2003, Annu Rev Biochem, 72: 573-608
- Cremer T *et al.* Analysis of chromosome positions in the interphase nucleus of Chinese hamster cells by laser-UV-microirradiation experiments; 1982, Hum Genet, 62: 201-209
- Misteli T. Spatial positioning: a new dimensions in genome functions; 2004, Cell, 119: 153-156
- Constantinescu D, Gray HL *et al.* Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation; 2005, Stem Cells, 24: 177-185
- Sperger JM, *et al.* Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors; 2003, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 100: 13350-13355
- Wiblin AE, Cui W, Clark A J, Bickmore WA. Distinctive nuclear organisation of centromeres and regions involved in pluripotency in human embryonic stem cell; 2005, J Cell Sci, 118: 3861-3868.
- Meshorer E, Misteli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation; 2006, Nat Rev Mol Cell Biol, 7: 540-546
- Meshorer E, Yellajoshula D, *et al.* Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic cells; 2006, Dev Cell, 10: 105-116
- Azuara V, Perry P, *et al.* Chromatin signatures of pluripotent cells lines; 2006, Nat Cell Biol, 8: 532-538
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, *et al.* A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells; 2006, Cell, 125: 315-326
- Kaneda M, Sado Y, *et al.* Role of de novo DNA methyltransferases in initiation of genomic imprinting and X-chromosome inactivation; 2004, Cold Spring Harbour Symp Quant Biol, 69: 125-129
- Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development; 2002, Nat Rev Genet, 3: 662-673
- Tsuji-Takayama K, *et al.* Demethylating agent 5-azaC reverses differentiation of embryonic stem cells; 2004, Biochem Biophys Res Commun, 323: 86-90
- Hattori N, Nishino K, *et al.* Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells; 2004, J Biol Chem, 279: 17063-17069
- Williams RRE, Azuara V, *et al.* Neural induction promotes large-scale chromatin reorganization of the Mash1 locus; 2006, J Cell Sci, 119: 132-140
- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals; 2003, Nat Genet, 33: 245-254
- Lee JH, Hart SR, Skalnik DG. Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation; 2004, Genesis, 38: 32-38

Corresponding author:

Dr. George Miloshev
 Laboratory of Molecular Genetics
 Institute of Molecular Biology
 Bulgarian Academy of Sciences
 "Acad. G. Bonchev" str., bl. 21
 1113 Sofia
 Bulgaria
 e-mail: miloshev@bio21.bas.bg

Адрес за кореспонденция
 Д-р Георги Милошев
 Лаборатория по Молекулярна Генетика
 Институт по Молекулярна Биология
 БАН
 ул. "Акад. Г. Бончев", бл. 21
 1113 София, България

ОБЩИ АСПЕКТИ НА ИН ВИТРО МАТУРАЦИЯТА НА ЧОВЕШКИ ОВОЦИТИ

Г. Ингилизова², Д. Тачева¹, Д. Петрова¹ и Я. Владимиров¹

¹ Център по Репродуктивна медицина и оплождане ин витро - София

² Катедра по цитология, хистология и ембриология, Биологически факултет,
СУ "Св. Климент Охридски"

COMMON ASPECTS OF IN VITRO MATURATION OF HUMAN OOCYTES

G. Ingilizova², D. Tacheva¹, D. Petrova¹ and I. Vladimirov¹

¹ Center of Reproductive Medicine and IVF, Sofia

² Chair of Cytology, Histology and Embriology, Faculty of Biological Sciences,
Sofia University "St. Kliment Ohridski"

Резюме: Методът ин витро матурация (IVM) се използва основно при жени, страдащи от синдром на поликистозните яйчници (PCOS) и жени с редовен менструален цикъл и нормални яйчници, лекувани чрез ин витро оплождане (IVF)/интрацитоплазмено спермално инжектиране (ICSI) поради тежък мъжки фактор. Освен това той успешно се прилага при пациентки със заболявания като активен системен Лупус еритематодес, както и с някои злокачествени заболявания, при които химиотерапията трябва да започне без отлагане. При тези жени ин витро матурацията на незрели овоцити е надеждна алтернатива на конвенционалната IVF процедура.

Ключови думи: матурация / IVM / IVF / човешки овоцити

Abstract: The method of in vitro maturation (IVM) is applied mainly in women suffering from polycystic ovary syndrome (PCOS) and regularly menstruating women with normal ovaries, treated with in vitro fertilization (IVF)/intra cytoplasmic sperm injection (ICSI) for severe male factor infertility. Also it is successfully applied in patients suffering from diseases, such as active systemic lupus erythematoses as well as for patients with malignant diseases, who are to be treated without delay. In vitro maturation of immature oocytes is a promising alternative to conventional IVF procedure for these women.

Key words: maturation / IVM / IVF / human oocytes

Въведение

Способността на незрелите овоцити да възобновяват спонтанно мейозата при отстраняването им от фоликулите е установена най-напред от Pincus и Epzman през 1935 г. (1) и по-късно е потвърдена от Edwards (2). През 1969 година Edwards et al. за първи път демонстрират оплождане на матурирани ин витро човешки яйцеклетки (3).

Незрелите овоцити се получават от фоликули с диаметър 2 – 10 mm чрез трансвагинална аспирация под ултразвуков контрол. Около 50 – 60% от ин витро узрелите овоцити са способни да възобновят мейозата и да достигнат стадий метафаза II (MII) след период на култивиране 28 – 36 часа. Процентът на оплождане на тези овоцити

е сравнително висок и при голяма част от тях се наблюдава ембрионално развитие.

Ин витро матурация, последвана от процедура на ин витро оплождане и ембриотрансфер (IVF – ET): По време на овариалната стимулация, в момента на инжектиране на hCG, популацията от овоцити може да бъде хетерогенна и това да доведе до аспириране на овоцити в различни етапи на матурация. Около 15% от овоцитите са в профаза I на мейозата. Тези овоцити могат да узреят ин витро и да се развият в жизнеспособни ембриони. През 1983 г., Veek и сътрудници съобщават за две бременности от ембриотрансфер на узрели ин витро овоцити, получени от стимулирани цикли за IVF-ET (4). За

подобни резултати съобщават и други изследователски групи.

Опитът в ин витро матурацията на човешки овоцити е придобит от две основни групи пациентки. Първата група са жени, страдащи от PCOS, тъй като при тях съществува значителен риск от развитите на овариален хиперстимулационен синдром (OHSS), в резултат на стимулацията с гонадотропни препарати в асистираната репродукция. Втората група са жени с редовен менструален цикъл и нормални яйчникови структури, които се подлагат на IVF/ICSI поради тежък мъжки инфертилитет.

Незрели овоцити, аспирирани от жени с PCOS: Trounson et al. описват първата бременност и раждането на здраво дете след IVM на незрели овоцити, аспирирани от пациентки с PCOS⁽⁵⁾. През следващата година е съобщено за друга бременност при пациентка с PCOS, лекувана с IVM процедура, комбинирана с ICSI и асистирано излюпване (assisted hatching)⁽⁶⁾. Barnes et al. сравняват процентите на матурация на овоцитите, оплождане и делене на ембрионите между нормално овулиращи жени и жени с PCOS⁽⁷⁾. Получените резултати за всички изследвани параметри са по-добри при първата група жени. Причината за този факт не е установена. По-късно, Cha et al. съобщават за 27,1% реализирани бременности⁽⁸⁾. Този висок процент е получен след трансфер на средно 6,3 ембриона за пациентка, докато процентът на имплантация все още е нисък (6,9%).

За подобряване на резултатите от процедурата е предложена стимулация с гонадотропини^(9,10) или аплициране на човешки хорионгонадотропин (hCG)⁽¹¹⁾ преди аспирацията на овоцитите и IVM. Suikkari et al. предлагат прилагане на ниски дози (37,5 IU) рекомбинантен фоликулостимулиращ хормон (rFSH) от предходната лутеална фаза до достигане на диаметър 10 mm на водещия фоликул⁽⁹⁾. Това води до повишаване на процентите на матурация и оплождане на овоцитите при жени с PCOS, но не са постигнати бременности. Полезният ефект от прилагането на гонадотропините е установен в изследване на Mikkelsen и Lindenberg⁽¹⁰⁾. Овоцитите, аспирирани след стимулация с rFSH за 3 дни са били сравнени с овоцити, получени от нестимулирани пациентки с PCOS. Стимулирането с гонадотропни препарати подобрява процентите на бременност (29 срещу 0%) и имплантация (21,6 срещу 0%) в сравнение с нестимулираната група.

През 1999 г. Chian et al. съобщават, че

инжектирането на 10 000 IU hCG 36 часа преди аспирацията на овоцитите подобрява процента на матурация на незрелите овоцити от пациентки с PCOS⁽¹²⁾. В по-късно изследване, същите автори демонстрират, че инжектирането на hCG също така и ускорява процеса на матурация⁽¹¹⁾. В изследване включващо 1000 цикъла с инжектиране на hCG преди аспирацията на овоцитите са постигнати 30 – 35% бременности⁽¹³⁾. Процентът на имплантация, обаче, все още е нисък (10–15%). Lin et al. съобщават за подобни проценти на бременност и имплантация след инжектиране на hCG⁽¹⁴⁾.

Незрели овоцити от жени с редовен менструален цикъл и нормални яйчникови структури: Регулирането на менструалния цикъл е сложен процес, включващ хипоталамо-хипофизната ос и локални (паракринни и автокринни) фактори. Фоликулите, предопределени да овулират, се селектират от кохорта фоликули с диаметър от 2–6 mm във фоликуларната фаза на менструалния цикъл. Селектираният фоликул нараства до диаметър 20–25 mm. Концентрациите на FSH и лутеинизиращия хормон (LH) в кръвообръщението регулират фазите на растеж и развитие на фоликулите. Повишението на серумната концентрация на FSH през ранната фоликуларна фаза инициира растежа на кохортата от фоликули. Доминантният фоликул може да бъде разграничен от другите фоликули в кохортата по размера си (диаметър > 10 mm). Синтезата на естрадиол е тясно свързана с развитието на преовулаторния фоликул. Повишението на концентрацията на естрадиола е основният фактор за установяване на доминантност. Чрез отрицателната обратна връзка, естрадиолът въздейства върху хипоталамо-хипофизната ос като понижава концентрацията на FSH. Докато доминантният фоликул е устойчив, останалите фоликули са чувствителни към това понижение и претърпяват атрезия, която може да бъде избегната чрез стимулация с FSH или чрез аспирация на незрели овоцити и IVM.

Mikkelsen et al. определят деня за аспирация на овоцитите, така че да съвпадне с периода на селекция на доминантен фоликул⁽¹⁵⁾. Фоликуларната пункция се извършва след ултразвуково установяване на водещ фоликул с диаметър 10 mm и дебелина на ендометриума най-малко 5 mm. В 87 цикъла са реализирани 18% бременности за ембриотрансфер. В няколко проучвания е изследван ефектът от стимулация с FSH преди аспирацията на незрели овоцити при жени с редовен менструален цикъл^(9, 16, 17, 18). Изследваните групи са малки, приложени са

разнообразни протоколи на стимулация и направените изводи са ограничени.

В изследванията на Wynn et al.⁽¹⁷⁾ и Suikkari et al.⁽⁹⁾ се съобщава за повишаване на броя и качеството на аспирираните овоцити след прилагане на лека овариална стимулация с FSH препарати преди аспирацията. От този експеримент, обаче, не могат да бъдат направени съществени изводи по отношение на способността за развитие на овоцитите, поради това, че Wynn et al. не реализират оплождане. В проспективно рандомизирано проучване на Mikkelsen et al. не е установен благоприятен ефект от стимулацията с FSH⁽¹⁸⁾. В едната изследвана група, овоцитите са аспирирани след стимулация с rFSH за 3 дни. В другата група, овоцитите са получени от нестимулирани цикли и денят на аспирация е определен след ултразвуково установяване на водещ фоликул с диаметър 10 mm. Авторите установяват, че стимулацията с FSH не увеличава броя на аспирираните овоцити и не повлиява процентите на матурация, оплождане, делене или бременност.

Техника за аспириране на овоцитите: Трансвагиналната аспирация на незрели овоцити под ултразвуков контрол е описана от Trounson и неговите сътрудници⁽⁶⁾. Те въвеждат две основни приспособления: нова по-твърда игла за аспирация с по-къс откос на върха (Cook Australia Ltd, Brisbane, Australia) и понижено налягане на помпата от 80 – 100 mmHg. Редица публикации описват аспирация без изплакване с хранителна среда на фоликули с диаметър от 2 до 10 mm.

Среда за култивиране: Сведенията по отношение на състава на културелната среда, използвана за ин витро матурация са недостатъчни поради факта, че са основани на данни от експерименти с човешки овоцити. Приема се, че присъствието на гранулозни клетки е благоприятно за ин витро матурацията при хора. До голяма степен, обаче, не е известно как гранулозните клетки подпомагат цитоплазмената матурация ин виво или ин витро.

Фоликулостимулиращият хормон е важен за развитието на преовулаторните фоликули ин виво и за индукцията на LH рецепторите и обикновено се добавя към културелната среда. Изследвания при хора потвърждават факта, че човешките овоцити отговарят на гонадотропините по време на IVM. Съобщено е за подобрене на овоцитната матурация и ембрионалното делене при култивиране в среда с добавени FSH и LH (19, 20). Човешкият хорион гонадотропин и LH са еднакво ефективни в

процеса на зреене на овоцитите ин витро⁽²¹⁾. Все още се изследват измененията в относителните концентрации на двата хормона с цел оптимизиране способността за развитие на яйцеклетките.

В средата за култивиране на незрели човешки овоцити обикновено се добавя серум. Като протеинови източници се използват серум от ембрионална пъпна връв и говежди фетален серум. Не се препоръчва добавянето на серум от други пациенти или от животни поради потенциален риск от замърсяване с инфекциозни агенти. Най-често при ин витро матурацията се използват серум от пациентката, човешки серумен албумин (HSA) или синтетичен серумен заместител (SSR). Концентрацията на серум в културелната среда варира между 7,5 и 20%, а концентрациите на HSA и синтетичния серумен заместител варират между 0,1 – 0,4 и 10% съответно⁽²²⁾. Значително по-високи проценти на узряване, бременност и имплантация са постигнати от овоцити, матурирани в културална среда с добавен серум, в сравнение с овоцити, матурирани в среда с добавен синтетичен серумен заместител⁽²³⁾. Серумът може да съдържа растежни фактори като епидермален растежен фактор и инсулиноподобен растежен фактор-I, които са важни за цитоплазмената матурация. Други фактори, като инхибини и активини, могат да подобрят ядрената матурация и последващото оплождане на незрелите овоцити⁽²⁴⁾.

Времеви интервал за матурация: Редица изследвания показват, че 80% от незрелите човешки овоцити осъществяват ядрена матурация (екструзия на първо полярно телце) и достигат до МП след период от 48 – 54 часа на култивиране^(5, 25). Други проучвания установяват, че голям брой МП овоцити могат да бъдат получени след 24 часа зреене, в резултат на значителен асинхрон в ядрената и цитоплазмената матурация. Ако тези овоцити се инсеминират след 48 часа, те ще бъдат блокирани в МП за 20 – 30 часа, което е повече от оптималното време за оплождане и може да компрометира техния потенциал за развитие. Наблюдавани са неблагоприятни последици при инсеминирането на стари овоцити, които вече са били в МП за 23 – 25 часа. За да се редуцира рискът рано узрелите овоцити да останат за продължителен период блокирани в МП, Smith et al. са изследвали последиците от скъсяването на продължителността на матурация на овоцитите от 36 на 28 часа⁽²⁶⁾. Не са наблюдавани значителни разлики в процентите на узряване, оплождане или бременност, когато овоцитите са

матурирани за 28 часа в сравнение с 36 часа. Периодът на матурация от 28 часа има значително предимство, поради факта, че позволява инсеминирането да се извърши през работните часове, докато ако периодът за IVM е 36 часа – то би трябвало да се извърши през нощта.

Оплождане, култивиране на ембрионите и подържане на лутеалната фаза: В сравнение с конвенционалните техники на инсеминиране, след инжектиране на сперматозоиди в човешки ин витро матурирани овоцити, процентите на оплождане са по-високи. Съобщено е за процент на оплождане 45%, когато овоцитите са инсеминирани конвенционално, в сравнение със 70 – 75%, когато е приложена ICSI процедура^(5, 25). Друго предимство на микроинсеминационните техники е изкуственото отстраняване на гранулозните клетки, в резултат на което е възможно да се установи екструзия на първото полярно телце, т.е. МП овоцитите. Понастоящем, конвенционалната IVF процедура се прилага успешно в случаите с нормални спермални параметри (Suikkari, лично съобщение).

Пунктирането на малки фоликули (4–10 mm) води до понижаване на стойностите на ендогенен естрадиол и прогестерон, продуцирани от гранулозните клетки, което може да възпрепятства имплантацията, в резултат на недостатъчно подготвен ендометриум. Това може да обясни ниския процент на имплантация, за който съобщават Trounson et al. през 1994 г.⁽⁶⁾. Необходимо е прилагането на заместване с екзогенен естрадиол и прогестерон да бъде синхронизирано с имплантационния прозорец и развитието на ембриона. От хормоналната подготовка на реципиенти на донорски овоцити е известно, че ранно делящите се ембриони най-добре се трансферират в ендометриалната кухина на трети или четвърти ден от приема на прогестерон⁽²⁷⁾. Mikkelsen et al. получават добри резултати след прием на естрадиол от деня на аспирацията и добавяне на прогестерон два дни по-късно⁽¹⁸⁾.

Заклучение и бъдещи перспективи: Ин витро матурацията на човешки овоцити днес може да се разглежда като клинично изпитан и приложим метод за лечение на безплодието, въпреки че много ключови въпроси в тази област все още са без отговор. Методът е благоприятен за пациентите и осигурява задоволителен процент клинични бременности. Протоколът за IVM е със скъсен период на терапия. При този протокол са елиминирани страничните ефекти от стимулацията, в частност OHSS, а финансовата

стойност е намалена в сравнение с конвенционалната IVF процедура.

В бъдеще би могло да стане възможно ин витро култивирането на фоликули в комбинация с IVM. В процес на разработване са техниките и условията за постигане на продължителен фоликуларен растеж на човешки примордиални фоликули, но все още не е съобщено за успешен метод. Известно е, че човешки примордиални фоликули могат да пролиферират до вторични фоликули дори след съхранение чрез замразяване. Продължават изследванията за оптимизиране на методите за замразяване на изолирани незрели овоцити и на цели човешки яйчници. Възможността на тази технология да съхрани фертилността при жени, изложени на риск от стерилитет поради лечение на злокачествени заболявания е перспектива с огромно значение.

Използвани източници:

1. Pincus G, Enzmann EV. The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro. *J Exp Med*, 1935; 62: 665–675.
2. Edwards RG. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet*, 1965, 926–929.
3. Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature*, 1969; 221: 632 – 635.
4. Veeck LL, Wortham JW Jr, Witmyer J et al. Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1983; 39: 594–602.
5. Trounson A, Wood C, Kausche A. In vitro maturation and fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril*, 1994; 62: 353–362.
6. Barnes FL, Crombie A, Gardner D et al. Blastocyst development and birth after in vitro maturation of human primary oocytes, intraplasmic sperm injection and assisted hatching. *Hum Reprod*, 1995; 10: 3243–3247.
7. Barnes FL, Kausche A, Tiglias J et al. Production of embryos from in vitro matured primary human oocytes. *Fertil Steril*, 1996; 65: 1151–1156.
8. Cha KY, Han SY, Chung HM. Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 2000; 73: 978–983.
9. Suikkari A-M, Tulppala M, Tuuri T et al. Luteal phase start of low-dose FSH priming of follicles results in an efficient recovery, maturation and fertilization of immature human oocytes. *Hum Reprod*, 2000; 15: 747–751.

10. Mikkelsen AL, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction*, 2001; 122: 587-592.
11. Chian RC, Buckett WM, Tulandi T et al. Prospective randomized study of HCG priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod*, 2000; 15: 165-170.
12. Chian RC, Gulekli B, Buckett WM, Tan SL. Priming with HCG before retrieval of immature oocytes in women with infertility due to the polycystic ovary syndrome. *New Eng J Med*, 1999; 341: 1624 - 1626.
13. Chian RC, Buckett WM, Tan SL. In vitro maturation of human oocytes. *Reprod BioMed Online*, 2004; 8: 148-166.
14. LinY-H, Hwang J-L, Huang L-W et al. Combination of FSH priming and hCG priming for in vitro maturation of human oocytes. *Hum Reprod*, 2003; 18: 1632-1636.
15. Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenberg S. Impact of oestradiol and inhibin A concentrations on pregnancy rate in in-vitro oocyte maturation. *Hum Reprod*, 2000; 15: 1685-1690.
16. Trounson A, Anderiesz C, Jones GM et al. Oocyte maturation. *Hum Reprod*, 1998; 13S: 52-62.
17. Wynn P, Picton HM, Krapez JA et al. Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by in-vitro maturation. *Hum Reprod*, 1998; 13: 3132-3138.
18. Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenberg S. In-vitro maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. *Hum Reprod*, 1999; 14: 1847-1851.
19. Prins GS, Wagner C et al.: Gonadotropins augment maturation and fertilization of human immature oocytes cultured in vitro. *Fertil Steril*, 1987; 47: 1035-1037.
20. Anderiesz C, Ferraretti A-P, Magli C et al. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. *Hum Reprod*, 2000; 15: 1140-1148.
21. Hreinsson J, Rosenlund B, Friden B et al. Recombinant LH is equally effective as recombinant hCG in promoting oocyte maturation in a clinical in-vitro maturation programme: a randomized study. *Hum Reprod*, 2003; 18: 2131-2136.
22. Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction*, 2001; 121: 51-75.
23. Mikkelsen AL, Høst E, Blåbjerg J et al. Maternal serum supplementation in culture medium benefits maturation of immature human oocytes. *Reprod BioMed Online*, 2001; 2: 112-116.
24. Alak BM, Smith GD, Woodruff TK et al. Enhancement of primate oocyte maturation and fertilization in vitro by inhibin A and activin A. *Fertil Steril*, 1996; 66: 646-653.
25. Russell JB, Knezevich KM, Fabian KF et al. Unstimulated immature oocyte retrieval: early vs. mid follicular endometrial priming. *Fertil Steril*, 1997; 67: 616-620.
26. Smith SD, Mikkelsen A, Lindenberg S. Development of human oocytes matured in vitro for 28 or 36 hours. *Fertil Steril*, 2000; 73: 541-544.
27. Rosenwaks Z. Donor eggs: their application in modern reproductive technologies. *Fertil Steril*, 1987; 47: 895-909.

Адрес за кореспонденция:

Д-р Десислава Тачева

Център по репродуктивна медицина и оплождане ин-витро „София“

бул. „Цар Борис III“ № 54, София

тел. 02/ 9549102

НОВИНИ ОТ СВЕТОВНАТА МРЕЖА

Д-р Г. Николов

МЦ "РепроБиоМед" - София

NEWS FROM THE INTERNET

Dr G. Nikolov

Medical center "ReproBioMed" Ltd - Sofia

Какво ли не може да се срещне като информация в Интернет! Наред с обявяването на програма за лечение на безплодието за гей-мъже в Лос Анджелис, САЩ (<http://ivf.net/ivf/index.php?page=out&id=2584&print=yes>), можем да се натъкнем и на някои интересни за нас проблеми. Ето някои от тях:

Ново проучване свързва вродените аномалии с асистираните репродуктивни технологии: На срещата на Дружеството по майчино-фетална медицина в Сан Франциско, канадски учени докладват, че в едно ново голямо проучване (върху 61,208 бременни жени) се оказва, че е налице сигнификантно нарастване на честотата на някои вродени дефекти след АРТ. Въпреки, че като цяло нарастването е от около 2 на 3 %, за някои аномалии различията са тревожни, напр. гастро-интестинални дефекти (над 8x), сърдечно-съдови малформации (над 2x) и др. Прави впечатление, че е налице право-пропорционална зависимост между сложността на АРТ метода и честотата на дефектите (най-голяма при IVF/ICSI и най-ниска при прилагането само на стимулиращи овулацията медикаменти). Тези данни налагат по-адекватен избор на метод за лечение (по-точно определени индикации) и по-добро предварително консултиране на пациентите.

HFEA продължава да препоръчва SET с цел намаляване на честотата на двуплодните бременности след IVF: Въпреки недоволството на някои медицински и пациентски организации, Human Fertility and Embryology Authority (HFEA) във Великобритания продължава да изисква въвеждането на трансфера на един ембрион след IVF, за да се редуцира честотата на двуплодните бременности след IVF. По данни на HFEA годишно в Англия умират над 120 бебета, поради това, че са близнаци, факт, който според властите е недопустим. Понастоящем центровете за асистирана репродукция във Великобритания са задължени да прилагат SET винаги, когато честотата на постигнатите от тях двуплодни

бременности надхвърли 10%.

Селекция на "точния" сперматозоид за ICSI: Селекцията на подходящи мъжки гамети при осъществяването на интраовоцитно инжектиране на сперматозоиди (ICSI) е критично по отношение крайния резултат от процедурата. То е затруднено поради редица причини, между които са времетраенето на микроманипулацията (минимизирането на времето за нейното извършване) и морфологичните критерии за избор на сперматозоиди (които може да са генетични и други дефекти). Във връзка с това се търсят непрекъснато нови методи за по-добра селекция.

Един отдавна известен тест (Schradler et al., 1986) е хипо-осмотичният суелинг тест (HOST), ползван за пръв път при ICSI през 1991 г. от Ved et al. Той дава възможност на биолога да избира лесно между живите неподвижни и мъртвите, но не е в състояние да дискриминира генетично добрите от лошите сперматозоиди.

Използването на силно увеличение по време на работа (6300 x) за оценка на морфологията на сперматозоидите може да доведе до по-висок процент успешни бременности (Bartoov et al., 2002). Все пак, този метод не се е наложил в рутинната практика, тъй като подобно увеличение влошава разделителната способност, има редица неудобства и поставя под въпрос реалната възможност за адекватна селекция.

Напоследък, южно корейски учени докладват за комбинация между флуоресцентна ин ситу хибридизация (FISH) и HOST, като при осъществяването на този метод са установили, че е налице корелация между наличието на анеуплоидии и качеството на хипо-осмотичния суелинг. По този начин HOST може да се превърне в ценен метод за минимизиране на анеуплоидиите при ICSI поради по-добра селекция на сперматозоиди (Pang et al., 2007)

Репродуктивна токсичност на стрептомицин:
В хранителните среди за култивация на овоцити и ембриони рутинно се поставят антибиотици – най-често пеницилин + стрептомицин. Въпросът за наличието на негативен ефект върху овоцитите и делящото се ембрио остава открит.

Напоследък, в едно проучване, Lemeire et al. (2007 г.) тестват токсичността на стрептомицина с четири различни метода при мишки:

1. Follicle Bio-Assay (FBA) – мулти-параметрично дългосрочно проучване върху система за култивиране на фоликули;
2. IVF при овоцити, изложени на действието на стрептомицин, последвано от оценка на клетъчното делене и забременяемостта;
3. Mouse Embryo Assay (MEA) – анализиращ развитието на предимплантационните ембриони;

4. Embryonic Stem Cell Test (EST) – по отношение на пост-имплантационната ембрио-токсичност на стрептомицина.

Резултатите сочат, че при експозиция на 50 µg/ml стрептомицин, е налице значимо спрямо контролите намаляване на МП овоцитите в първия тест (40% срещу 92%), намаляване на фертилизационния индекс (0.23 срещу 0.74) и забременяемостта при втория тест; липсва установен ефект на стрептомицина при МЕА и EST.

Въпреки че тези проучвания са върху миши овоцити и ембриони, следва да се подхожда по-внимателно при ползването на стрептомицин в хранителните среди за култивация на човешки репродуктивни клетки и тъкани.

Предстоящи международни научни форуми:

1. The 1st International Congress on Health Genomics & Biotechnology, Техеран, Иран; 24-26 Ноември, 2007 г., организиран от Иранския Pasteur Institute. Ще се разглеждат теми, като
 - Геномика и биотехнология при неинфекциозните заболявания;
 - Генетика на някои човешки патогени;
 - Био-етика, био-безопасност в геномиката и биотехнологиите;
 - Биофармация и др.

Повече информация на адрес: <http://www.hgb.ir>;
Адрес на секретариата: hgb@hgb.ir

2. International Conference on Ethics of Stem Cell Research and Moral Responsibility in ART, Гент, Белгия; 30 Ноември – 1 Декември, 2007 г., организиран от ESHRE SIG “Etics and Law” и Института по Био-етика в Гент. Ще се разглеждат две групи теми:
 - Етични аспекти на изследванията със стволови клетки и клонирането при човека;
 - Морално-етични аспекти на асистираната репродукция;

Повече информация на адрес: <http://www.eshre.com/emc.asp?pageId=928>

3. Second World Congress on Human Oocyte Cryopreservation, Болоня, Италия; 30 Ноември – 02 Декември, 2007 г., организиран от Университета на Болоня. Фокусиран върху различните предизвикателства и методите за криоконсервация на овоцити.

Повече информация на адрес: <http://www.eshre.com/emc.asp?pageId=987>

4. Два симпозиума, организирани от Serono Symposia Int.
 - Gene, Environment, Lifestyle Interaction and Human Reproduction, Малмьо, Швеция; 7-9 Февруари, 2008 г.;
 - Regulation of Follicle Development and its Clinical Implications, Бьоне, Франция; 23-24 Май, 2008 г.;

Повече информация на адрес: www.seronosymposia.org/en/home/page.html

5. The 8th International Symposium on Preimplantation Genetic Diagnosis, Барселона, Испания; 23-25 Април, 2007 г.;

Повече информация на адрес: <http://www.eshre.com/emc.asp?pageId=955>

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 асистиранията репродукция. Кратките предварителни съобщения, публикувани в това списание, могат в последствие да бъдат отпечатвани в разгърнат вид и в други научни списания.

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

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

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

За повече информация и изпращане на материали:

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

E-mail: gnikolov@yahoo.com;

plamen@ivf.zzn.com

Тел.: 088 870 3786 (д-р Г. Николов)

088 821 7095 (П. Тодоров)

Женствени от изгрева

до залеза



UTROGESTAN[®] 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

ЕЛТА '90

ПРОДУКТИ
ЗА СЪВРЕМЕННАТА IVF ЛАБОРАТОРИЯ



АПАРАТУРА
РЕАКТИВИ
КОНСУМАТИВИ

SANYO

SANYO E&E Europe BV
Medical Division
Biomedical Business Unit

Gynetics



greiner bio one

FertiPro

RI

Masters of Micromanipulation

Тел: (02) 983 96 49, 983 22 09 • Факс: (02) 983 22 11
E-Mail: elta90@dir.bg • www.elta90.com

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